

SÉRIE A, N° 931

N° D'ORDRE

955

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

PAR

Kul Bhushan SHARMA

1^{re} THESE. — Recherches sur l'immunité et l'allergie dans la tuberculose
expérimentale en cultures cellulaires.

2^e THESE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 9 Juin 1961 devant la Commission d'examen.

MM. A. THOMAS *Président*

SOULAIRAC }
BARRAUD } *Examineurs*

SÉRIE A, N° 931

N° D'ORDRE

955

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention Sciences)

PAR

Kul Bhushan SHARMA

1^{re} THESE. — Recherches sur l'immunité et l'allergie dans la tuberculose expérimentale en cultures cellulaires.

2^e THESE. — Propositions données par la Faculté.

Soutenues le 9 Juin 1961 devant la Commission d'examen.

MM. A. THOMAS *Président*

SOULAIRAC }
BARRAUD } *Examineurs*

THÈSES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

LE TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES
EST DÉcerné PAR

ANNALES CHIMIA



LE TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES EST DÉcerné PAR L'UNIVERSITÉ DE PARIS
EXPÉDIENTS EN VERTU DES DÉCRETES

LE TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES EST DÉcerné PAR L'UNIVERSITÉ DE PARIS

LE TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES EST DÉcerné PAR L'UNIVERSITÉ DE PARIS

LE TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES EST DÉcerné PAR L'UNIVERSITÉ DE PARIS

LE TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES EST DÉcerné PAR L'UNIVERSITÉ DE PARIS

LE TITRE DE DOCTEUR EN SCIENCES EST DÉcerné PAR L'UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PERES

G. JULIA	T Analyse supérieure et algèbre supérieure.	PONCIN	T Mécanique générale.
DE BROGLIE	T Théories physiques.	DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres.
PRENANT	T Anatomie et histologie comparées.	QUELET	T Chimie organique.
PERES	T Mécanique des fluides et applications.	CAGNIARD	T Géophysique appliquée.
BOURCART	T Géographie physique et géologie dynamique.	CHAMPETIER	T Chimie macromoléculaire.
PLANTEFOL	T Botanique.	CUVILLIER	T Micropaléontologie.
GRASSE	T Evolution des êtres organisés.	JUNG	T Pétrographie.
PREVOST	T Chimie organique.	TRILLAT	T Microscopie et diffraction électronique.
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la géométrie.	WIEMANN	T Chimie organique et structurale.
CHAUDRON	T Chimie appliquée.	JACQUINOT	T Spectroscopie Orsay).
WYART	T Minéralogie et cristallogr.	VASSY	T Physique de l'atmosphère.
TEISSIER	T Zoologie.	DESTOUCHES	T Théories physiques.
MANGENOT	T Biologie végétale (Orsay).	M. PRUVOST	T Géologie.
P. AUGER	T Physique quantique et relativité.	AMIEL	T Chimie des solides.
MONNIER	T Physiologie des fonctions.	HOCART	T Minéralogie et cristallogr.
PIVETEAU	T Paléontologie.	J.-P. MATHIEU	T Recherches physiques.
ROCARD	T Physique (E.N.S.).	COUTEAUX	T Biologie animale (P.C.B.).
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.).	MAY	T Zoologie (Orsay).
LAFFITTE	T Chimie générale.	CHOQUET	T Théorie des fonctions et Topologie.
FAVARD	T Géométrie supérieure.	FELDMANN	T Biologie végétale (P.C.B.).
COULOMB	T Physique du globe.	GUINIER	T Physique des solides (Orsay).
Mlle COUSIN	T Biologie.	JOST	T Physiologie comparée.
CHRETIEN	T Chimie minérale.	FORTET	T Calcul des probabilités.
P. DRACH	T Zoologie.	SCHWARTZ	T Calcul différentiel et intégral.
KASTLER	T Physique (E.N.S.).	CHOUARD	T Physiologie végétale.
EPHRUSSI	T Génétique.	MALAVARD	T Aviation (Techn. Aéronaut.).
RIVIERE	T Géologie (Orsay).	BRELOT	T Calcul différentiel.
GAUTHERET	T Biologie (P.C.B.).	NORMANT	T Synthèse organique générale.
LUCAS	T Recherches physiques.	BENARD	T Chimie (E.N.S.C.P.).
A. THOMAS	T Biologie cellulaire.	BUVAT	T Botanique (E.N.S.).
ARNULF	T Optique appliquée.	DUGUE	T Statistiques mathématiques.
M. MORAND	T Physique enseignement.	SOULAIRAC	T Psychophysiologie.
SOLEILLET	T Physique (P.C.B.).	ULRICH	T Physiologie végétale (E.N.S.).
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides.	MARECHAL	T Optique théorique et appliquée.
DANJON	T Astronomie.	KIRRMANN	T Théories chimiques.
PETIT	T Biologie maritime.	CHADEFAUD	T Botanique.
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique.	Mlle LE BRETON	T Physiologie
GALLIEN	T Embryologie.	SALEM	T Mathématiques générales.
EICHHORN	T Biologie végétale (P.C.B.).	LELONG	T Mathématiques générales.
DE CUGNAC	T Biologie végétale (S.P.C.N.).	DEVILLERS	T Anatomie et histologie comparées.
Mlle CAUCHOIS	T Chimie physique.	EHRESMANN	T Topologie algébrique.
THELLIER	T Physique du globe.	FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.).
L'HERITIER	T Biologie générale (Orsay).	GLANGEAUD	T Géographie physique et géologie dynamique.
GRIVET	T Radioélectricité (Orsay).	GODEMENT	T Mathématiques (M.P.C.).

PISOT	T	Calcul des probabilités.
ROCH E.	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Paléontologie stratigraphique.
ZAMANSKY	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique (P.C.B.).
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
M ^{me} TONNELAT	T	Relativité.
DIXMIER	T	Mathématiques (M.P.C.).
SOUCHAY	T	Chimie (P.C.B.).
AIGRAIN	T	Electrotechnique générale.
BRUSSET		Chimie minérale.
M. LEVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
M ^{me} CHAIX	T	Chimie biologique.
M ^{me} HUREL-PY		Biologie végétale (P.C.B.).
PIAUX	T	Chimie (S.P.C.N.).
BRUN	T	Mécanique expérimentale des fluides.
LEDERER	T	Chimie biologique.
M ^{me} DUBREIL	T	Mathématiques (Agreg.)
M ^{me} LELONG	T	Mathématiques (E.N.S.).
BELLAIR	T	Géologie (S.P.C.N.).
COTTE	T	Physique (M.P.C.).
DUBOIS J.-E.	T	Chimie (M.P.C.).
LAMOTTE	T	Zoologie (E.N.S.).
MICHEL André	T	Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T	Energétique général.
ROUAULT	T	Physique
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie - Physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER		Biologie animale (P.C.B.).
CAMUS		Biologie végétale (P.C.B.).
CASTAING	T	Physique (Orsay).
CURIEN	T	Minéralogie et cristallographie.
MOYSE	T	Physiologie végétale (Orsay).
PANNETIER	T	Chimie (Orsay).
POSSOMPES	T	Biologie animale (P.C.B.).
PULLMANN		Chimie théorique.
TEILLAC	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay)
TONNELAT		Biologie physico-chimique.
VILLE	T	Econométrie.
WILLEMART		Chimie (P.C.B.).
DODE	T	Chimie (Orsay).
FREYMAN	T	Physique (S.P.C.N.).
GUINOCHET	T	Biologie végétale (Orsay).
ROLLET	T	Chimie (P.C.B.).
Mlle JOSIEN	T	Chimie (P.C.B.).
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Electronique (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques (Orsay).
DENY	T	Mathématiques générales (Orsay).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
LUCAS G.	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie - Physique.
BERTHELOT	T	Physique fondamentale des Hautes énergies (Orsay).

BRICARD	T	Météorologie.
M ^{me} ALBE-FESSARD		Psychophysiologie.
FRIEDEL		Physique des solides (Orsay).
M. JULIA		Chimie organique structurale.
LENDER		Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay).
MAGAT		Physico-chimie des rayonnements.
M ^{me} QUINTIN	T	Electrochimie.
MONOD	T	Biochimie cellulaire.
BENOIT	T	Physiologie animale (Orsay).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.
CHARLOT	T	Chimie analytique.
HAISSINSKY	T	Radiochimie.
LEMEÉ	T	Physiologie B.M.P.V. (Orsay).
GUERIN	T	Chimie (Orsay).
CHATELET M.		Chimie (P.C.B.).
JEAN		Physique (Orsay).
MATTIER	T	Physique (Orsay).
MICHEL Louis		Physique théorique (Orsay).
RUMPF		Chimie (P.C.B.).
BERGERARD		Biologie animale (S.P.C.N.) (Orsay).
BERTEIN		Electronique (Orsay).
BOUSSIÉRES		Chimie des Radioéléments (Orsay).
M ^{me} COUTURE		Thermodynamique et mécanique physique.
ELLENBERGER		Géologie appliquée.
FRANC		Biologie animale (P.C.B.).
SCHNELL		Botanique tropicale (Orsay).
STOLKOWSKI		Biologie Animale (P.C.B.).
ACHER		Chimie Biologique (Orsay).
BAUDOIN		Biologie.
BEAUMONT		Biologie animale.
BLAMONT		Géophysique ionosphère.
BOURREAU		Biologie végétale (S.P.C.N.) (Orsay).
CURIE D.		Physique (M.G.P.).
DURAND-DELGA		Géologie.
FREON		Chimie organique (Orsay).
HELLER		Physiologie végétale.
TORTRAT		Calcul des probabilités.
CAILLEUX		Géologie (S.P.C.N.).
MAGNAN	T	Physique (P.C.B.).
DAUDEL		Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la physique nucléaire.
M ^{me} FOURCROY		Biologie végétale (S.P.C.N.).
BARRAUD		Physiologie cellulaire.
NOIROT		Evolution des êtres organisés.
M ^{me} FOURES-BRUHAT	T	Mécanique analytique et mécanique céleste.
M ^{me} VEIL		Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNCK	T	Mécanique physique et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie (Orsay).
BROCHARD	T	Physique P.C.B. (Orsay).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Mathématiques M.P.C. (Orsay).
MAZET	T	Mécanique générale (Orsay).

Secrétaire général ... R. POUILLAIN.

A mes Parents

A ma femme

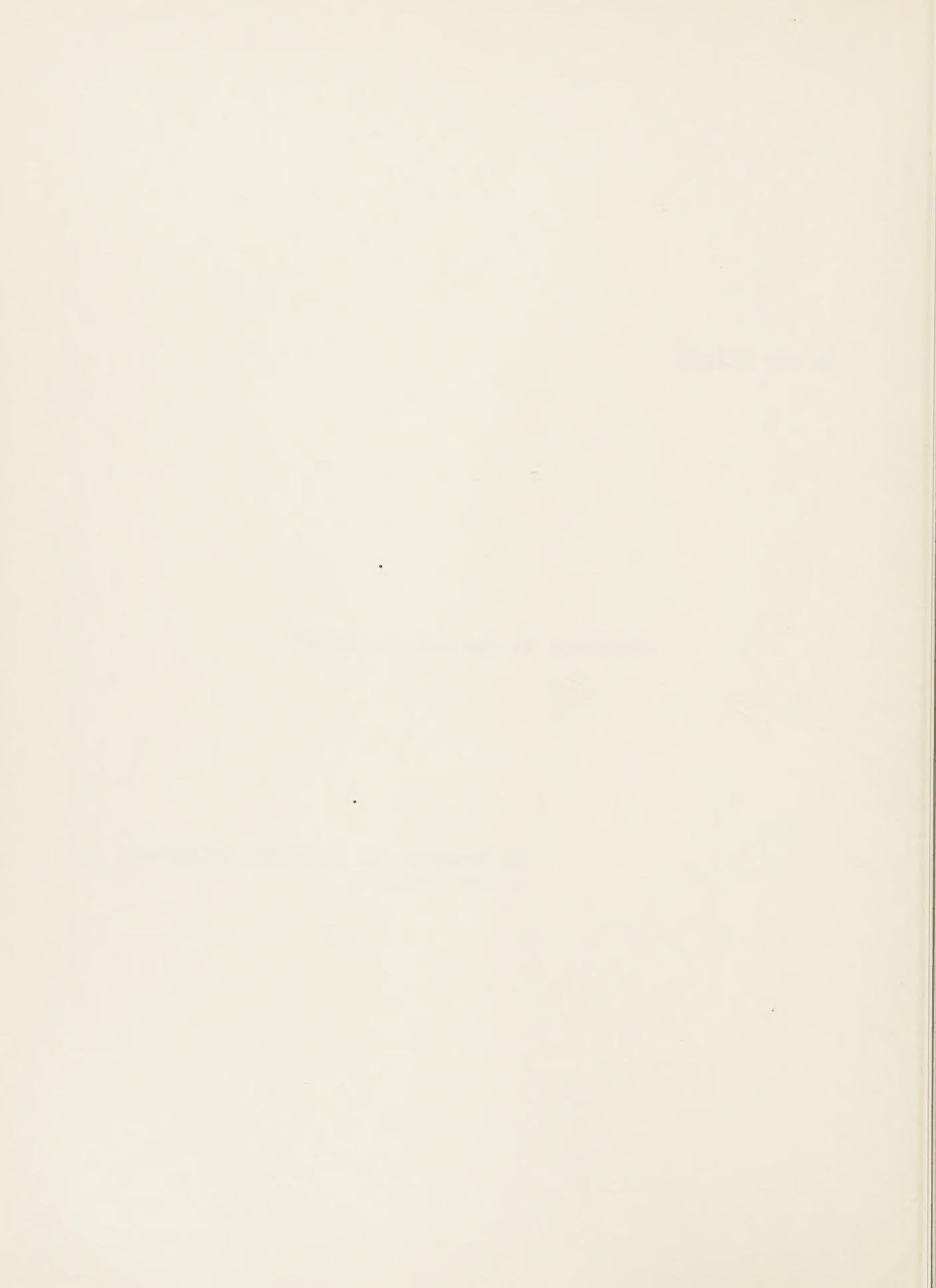
A mes Amis



A mon Maître

Monsieur le Docteur J. BRETEY

En hommage de profonde gratitude
et de respect.



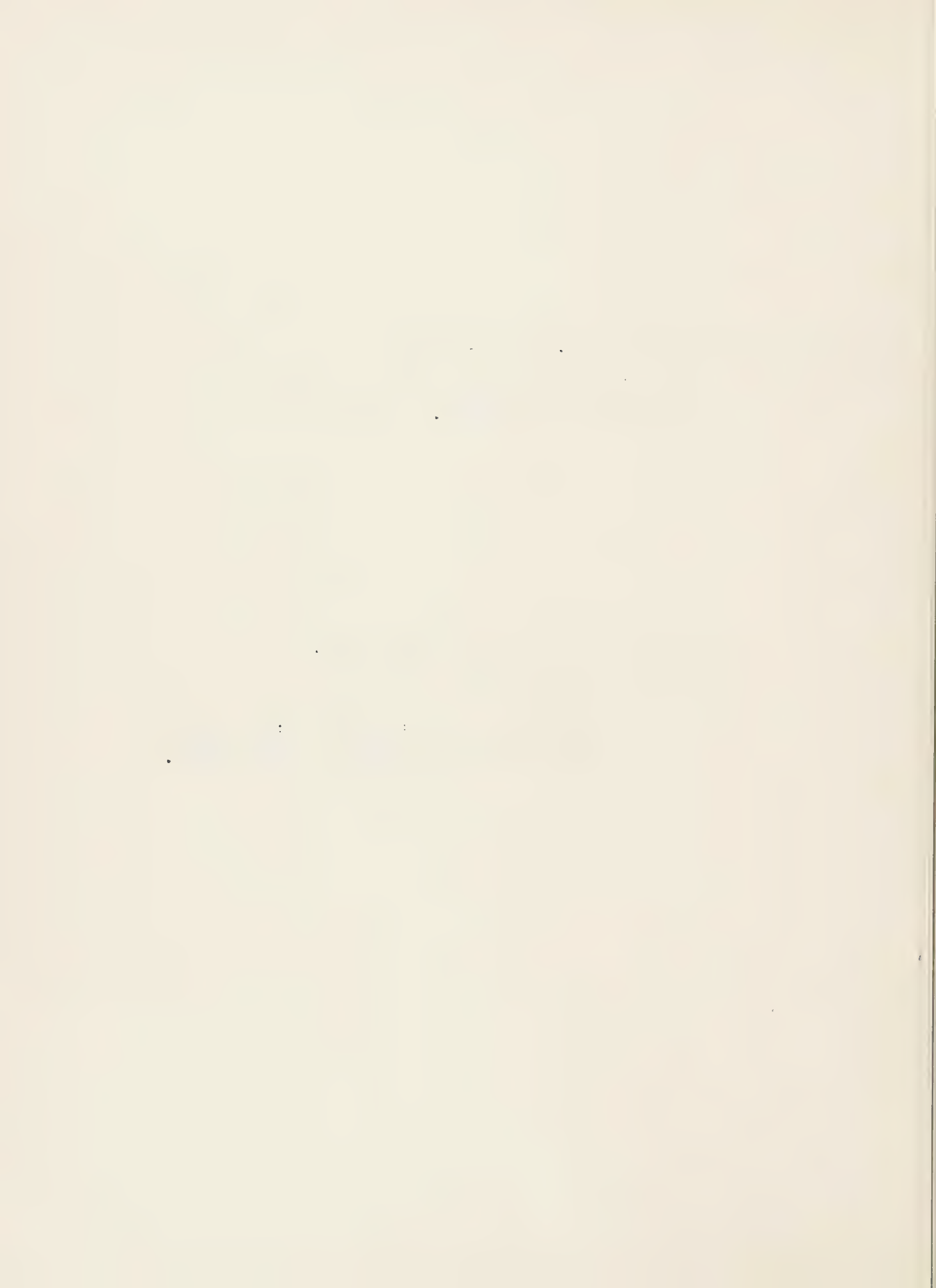
A Monsieur le Professeur J. ANDRE-THOMAS

qui m'a fait le grand honneur d'accepter de
présider cette thèse.

A Monsieur le Professeur SOULAIRAC, et

A Monsieur le Professeur BARRAUD

qui m'ont fait l'honneur d'accepter de
faire partie du Jury de cette thèse.



Je remercie Monsieur le Professeur TREFOUEL, Directeur de l'Institut Pasteur, grâce à la bienveillance duquel m'ont été ouvertes les portes de l'Institut Pasteur et qui m'y a accueilli si aimablement.

Ce travail a été réalisé dans le Service de la Tuberculose de l'Institut Pasteur, sous la direction de Monsieur le Docteur J. BRETEY qui a bien voulu me recevoir dans son laboratoire. Son aide précieuse m'a permis d'effectuer ce travail. Son intérêt et ses conseils ne m'ont jamais été ménagés et ses encouragements continuels m'ont toujours été prodigués au cours de mes recherches. L'hommage que je lui adresse ne pourra jamais entièrement acquitter l'immense dette de gratitude que j'ai contractée à son égard. Qu'il veuille trouver ici l'expression de ma plus vive reconnaissance.

Je remercie également Monsieur le Docteur PANTHIER, Chef du Service de la Fièvre Jaune qui m'a aimablement permis de travailler dans ce Service.

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur C. HANNOUN qui m'a initié aux techniques de culture de tissu. A chaque étape, il m'a fait bénéficier de son expérience, de ses encouragements et de son aide. Il m'est difficile de lui exprimer en quelques mots tout ce que je lui dois.

Je suis très reconnaissant à Madame ROY et Mademoiselle LAROCHE, dont j'ai partagé le laboratoire, qui m'ont toujours témoigné une amicale sympathie qui a été un grand secours moral et scientifique.

Je remercie très sincèrement Monsieur le Docteur LE QUAN SANG, qui, en suivant mes travaux avec un grand intérêt, m'a constamment prodigué ses conseils judicieux.

Qu'il me soit permis de remercier toute l'équipe du Service de la Tuberculose, du Service de la Fièvre Jaune et du Service de Photographie. Je leur témoigne ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

Je tiens, enfin, à exprimer ma reconnaissance au Gouvernement Français dont l'aide matérielle m'a permis de réaliser ce travail.

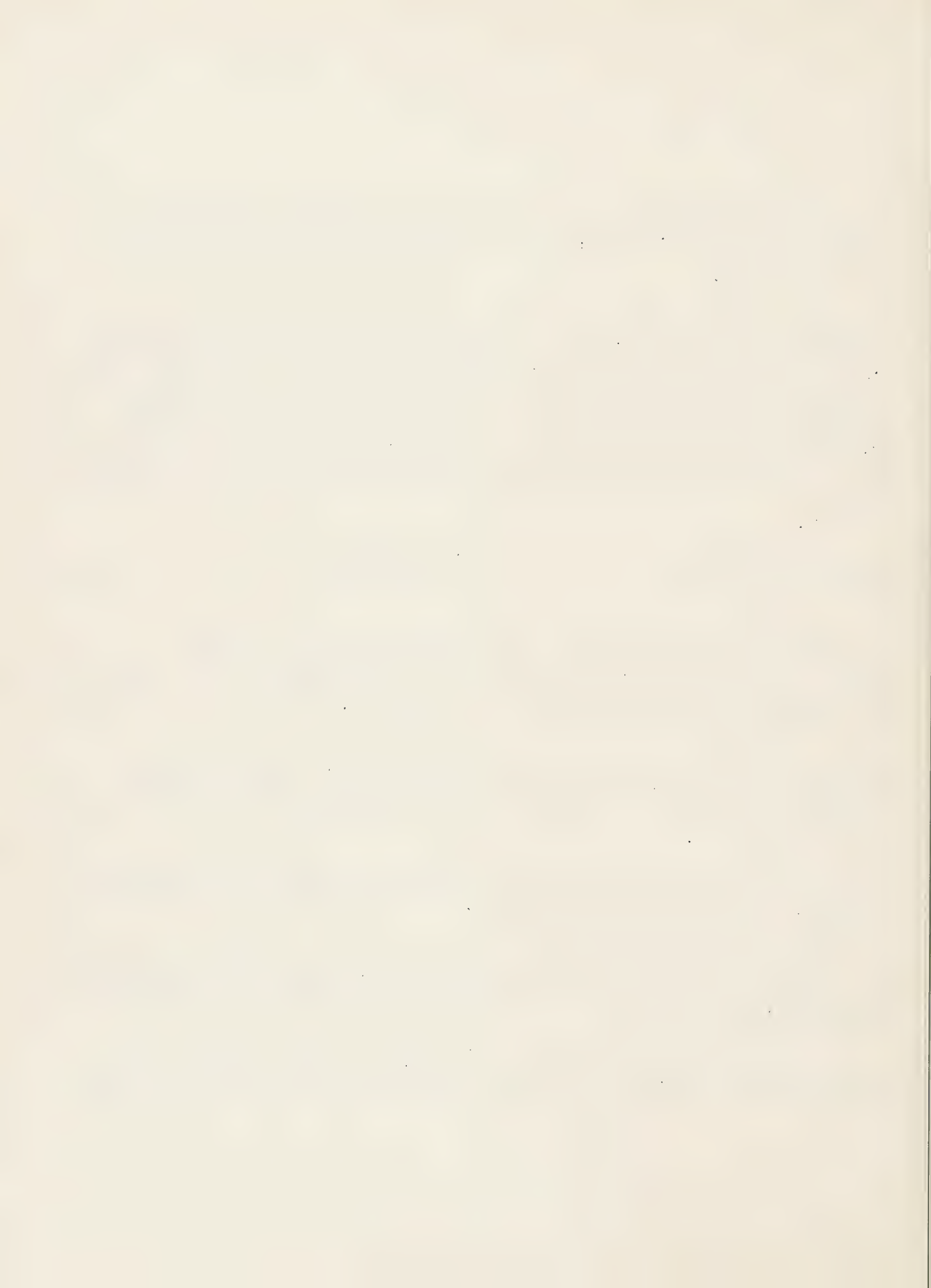


TABLE des MATIERES

	Pages
I - Introduction	1
II - Techniques expérimentales	7
III - Comportement des cellules en culture	13
IV - Etude des facteurs humoraux	17
V - Etude des facteurs cellulaires	27
VI - Etude simultanée des facteurs humoraux et cellulaires	46
VII - Etude sur l'allergie	51
VIII - Résumé et conclusions	60
IX - Bibliographie	64

.....
.....
.....

.....
.....

.....
.....
.....
.....
.....

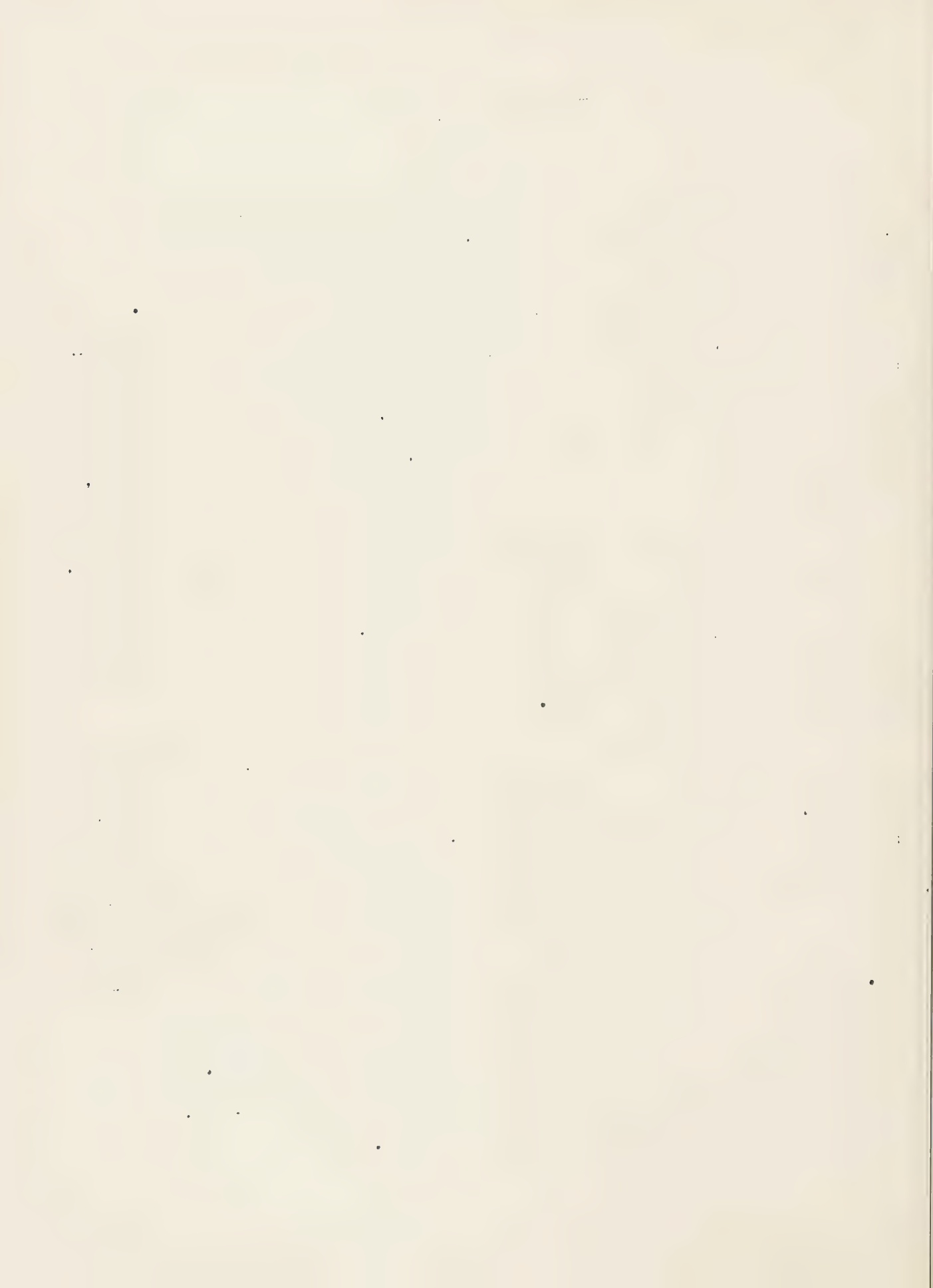
I - INTRODUCTION

Malgré le grand progrès fait dans le diagnostic, la prophylaxie et le traitement de la tuberculose, il n'est pas encore possible d'établir le mécanisme exact de l'immunité dans cette maladie.

Pendant très longtemps l'allergie était considérée comme synonyme d'immunité, et jusqu'alors c'est la seule méthode permettant d'établir l'état d'immunité d'un organisme. Depuis une trentaine d'années plusieurs chercheurs dont Nègre, Boquet et Bretey en tête, ont prouvé que la résistance contre la tuberculose est différente de l'allergie et persiste longtemps après que l'allergie ait disparu.

Puis on a essayé de savoir si les anticorps circulants jouaient un rôle dans la résistance contre l'infection. Jusqu'ici les essais de transfert de l'immunité passive par injections de sérums et les expériences in vitro ont échoué.

Au cours de ses études sur la tuberculose Koch (26, 27) avait observé la phagocytose des bacilles tuberculeux par les mononucléaires du sang. Peu après Metchnikoff (48, 49) décrivit le mécanisme de l'inflammation dans les maladies diverses y compris la tuberculose. Il insista beaucoup sur le rôle important des grands mononucléaires du sang dans les infections et surtout sur leur propriété phagocytaire. Il pensait que les monocytes sont les précurseurs des cellules géantes et épithélioïdes trouvées dans un tubercule. Ses observations étaient corroborées par plusieurs auteurs (11, 12, 63) et Maximow les reproduisit en cultures de tissu.

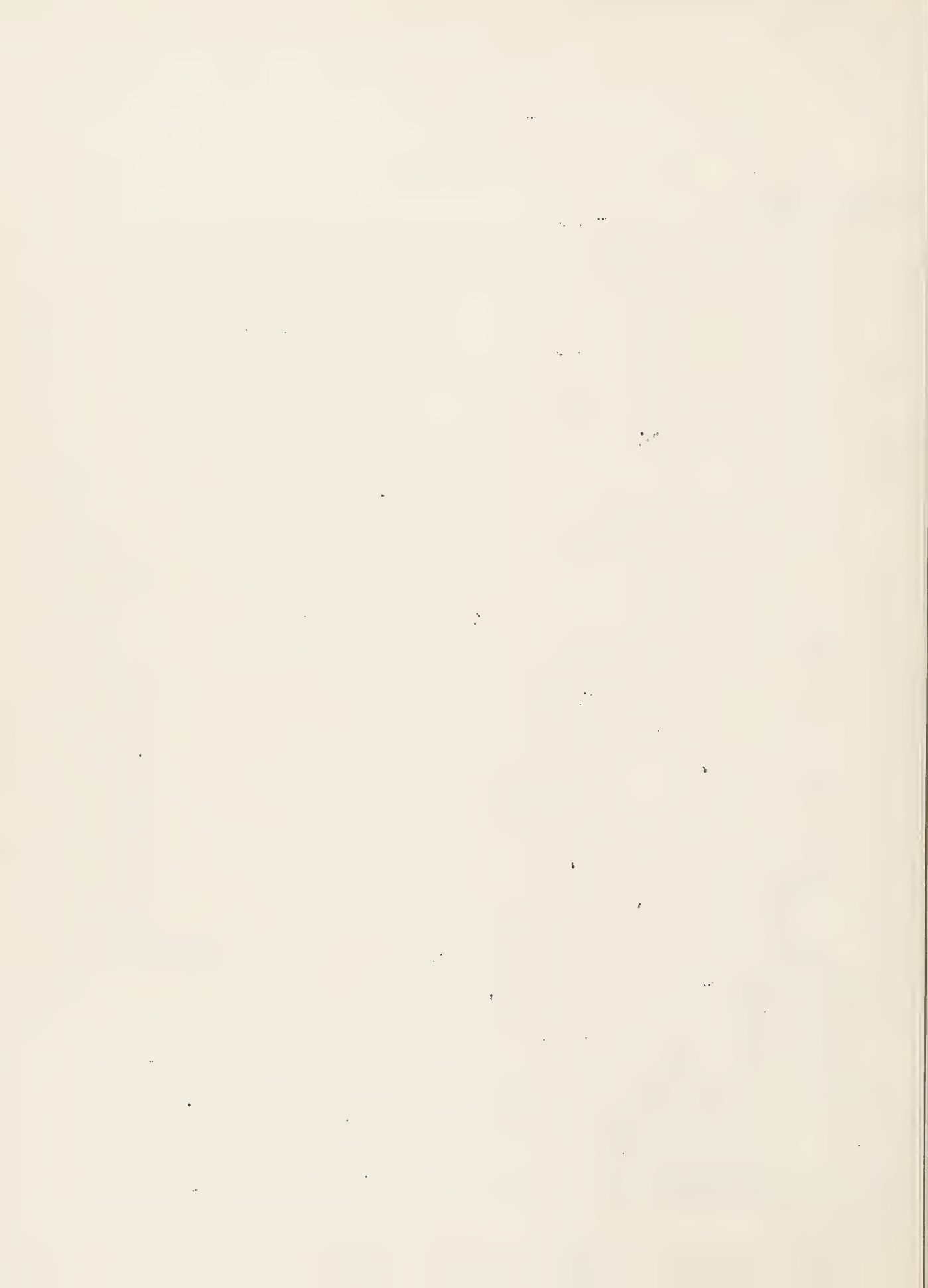


Les monocytes :

Aschoff et Kiyono (4), Goldman (19) et Evans (14) décrivirent la technique de colorations vitales des cellules sanguines ouvrant ainsi une étude intéressante sur le développement, l'origine et la fonction des mononucléaires. Schilling (64) en 1912 décrivit deux variétés distinctes de mononucléaires et les appela lymphocytes et grands mononucléaires. Un peu plus tard Naegeli donna le nouveau nom de monocytes aux grands mononucléaires.

Reschad et Schilling (60) étudièrent des monocytes purs dans un cas de leucémie monocyttaire et établirent que les monocytes sont d'un type distinct des autres leucocytes. Aworow et Timofejewsky (5) démontrèrent que les monocytes du sang et les macrophages du sang doivent être de même espèce. Enfin Schilling (65) en 1919 prouva que des macrophages d'origine sanguine et tissulaire ne sont qu'une espèce de cellules. Heatherington et Pierce (23) en cultures du sang et du tissu conjonctif ne trouvèrent pas de différence entre les deux types de macrophages. Il a été ensuite montré que les cellules de la microglie, histiocytes et monocytes sont les mêmes morphologiquement et fonctionnellement c'est-à-dire appartiennent au système réticulo-endothélial (13).

Dans son Mémoire de 1949, J. André Thomas (71) a donné quelques éclaircissements sur le système dit réticulo-endothélial. Pour des raisons histologiques il conseille de l'appeler "système réticulo-histiocytaire" ou "système métabolique-histiocytaire". Il écrit :



"Il existe un état histiocytaire qui n'est pas limité aux "histiocytes" du tissu conjonctif. Cet état peut être adopté par des cellules dérivées non seulement du mésenchyme, mais aussi par certaines autres, d'origine tissulaire et embryologique diverse : cellules musculaires striées et lisses, osseuses, de la gaine de Schwau, épithéliales. Tous ces éléments acquièrent l'état histiocytaire à la suite de transformations réactionnelles complexes, portant à la fois sur leur structure cytologique et sur leurs propriétés physiologiques Une fois acquis l'état histiocytaire est stable, mais les cellules néoformées passent reversiblement, selon les incitations (histamine, etc...), du stade de l'histiocyte actif à celui de l'histiocyte quiescent et éventuellement à celui de cellule réticulaire". Il dit plus loin "Au tissu conjonctif s'incorporent donc des cellules qui ont pris le type conjonctif, mais qui semblent pouvoir conserver, au moins pendant un certain temps, leur spécificité élaboratrice fondamentale, en rapport avec leur origine histologique. L'ancienne conception du système réticulo-endothélial, forme active et transitoire du mésenchyme, paraît périmée".

Etudes en cultures de tissu

Smyth (66) employa pour la première fois la technique des cultures de tissu par les bactéries pour étudier le mécanisme et les conditions de l'invasion microbienne. Continuant ses études (67) il cultiva des bacilles tuberculeux sur des cellules de tissus d'embryon de poulet (rate, coeur, peau et foie). Ses études ont été d'une très courte durée.

Maximow (44,-47) reproduisit le processus tuberculeux en cultures de tissu avec son élève Lang (28). Il montra la formation du tubercule et prouva que les monocytes sont précurseurs des cellules épithélioïdes et géantes.

Rôle des monocytes dans l'immunité

Rich et Lewis (61) prouvèrent que l'allergie cellulaire peut être transférée dans les cultures de monocytes et de tissu. Leurs expériences étaient confirmées par plusieurs chercheurs (3, 25, 29, 52, 53) et partiellement par O'Neill et Favour (56) qui pensent que l'allergie est démontrée seulement par les cellules appartenant au système réticulo-histiocytaire.

Lurie (36, 37) démontra une action inhibitrice des monocytes des lapins immuns sur la croissance du bacille tuberculeux, en les cultivant in vivo, puis Suter (68) cultiva les cellules infectées in vitro et confirma les observations de Lurie.

Par ailleurs Barski (6) prouva que la concentration bactériostatique de la streptomycine est plus élevée pour les bacilles intracellulaires que pour les bacilles extracellulaires. Cette observation facilita le travail des chercheurs ultérieurs en permettant de supprimer la croissance extracellulaire tout en conservant la multiplication intracellulaire du bacille tuberculeux.

Mackaness (43) ne trouva aucune action inhibitrice par les monocytes d'animaux vaccinés, tandis que Fong et coll. (18) ont montré que les monocytes immuns résistaient à la dégénérescence à la

suite de l'infection par le bacille tuberculeux. Berthrong et Hamilton (7) ont aussi montré une action inhibitrice des monocytes immuns mais non de monocytes immuns désensibilisés. Ils pensent que l'interprétation de ces résultats a été compliquée par l'adjonction de streptomycine du milieu.

Il ressort de ces travaux qu'il y a deux opinions. Le premier groupe de chercheurs a trouvé que les facteurs cellulaires jouent un très grand rôle de protection chez les êtres immuns et non les facteurs humoraux. L'autre groupe (43, 20) n'a pas retrouvé en cultures cellulaires le rôle des tissus dans l'immunité.

Orientation de nos recherches

Nous nous sommes proposés de comparer les infections massives (comme dans les expériences de Berthrong et Hamilton, Mackaness) et légères (comme Suter, Sho Abe) des monocytes, avec ou sans addition de streptomycine au milieu de croissance et nous choisirons la technique la plus convenable.

Nous avons cherché d'abord à savoir si le facteur sérique joue un rôle dans le mécanisme d'immunité. Dans les études in vivo il est montré que les anticorps ne peuvent empêcher l'infection tuberculeuse.

Puis nous avons étudié les facteurs cellulaires. Nous avons comparé la croissance bacillaire dans les cellules normales, vaccinées, vaccinées désensibilisées, et tuberculeuses. Nous en avons aussi profité pour étudier le renforcement s'il y a lieu par

l'addition de sérums homologues aux cellules.

Nous avons également fait quelques expériences sur l'allergie, pour comparer, en particulier, l'action de la tuberculine sur les cellules vaccinées et vaccinées désensibilisées.

II - TECHNIQUES EXPERIMENTALES

1 - Obtention des monocytes à partir de la cavité péritonéale du cobaye :

- a) Préparation du cobaye : Une semaine avant l'expérience 1 cm³ d'huile de paraffine stérile est injecté par voie intrapéritonéale. L'huile de paraffine s'est montrée le meilleur agent de production de l'exsudat chez les cobayes. Les essais faits avec une solution de glycogène (0,5 mg/cm³) (d'après Sho Abe (12) et avec du bouillon n'ont fourni qu'une récolte très pauvre 3 à 400.000 cellules environ. L'avantage de cette méthode était l'absence de gouttes d'huile dans le cytoplasme des monocytes. Mais les gouttes d'huile ne modifient pas la croissance des bacilles et des cellules. Après 5-6 jours les gouttes d'huile disparaissent.
- b) Prélèvement de l'exsudat : 40 cm³ de liquide de Hanks (21) hépariné sont introduits dans la cavité péritonéale avec une seringue de 20 cm³ munie d'une aiguille de 20/10 à biseau court. L'abdomen du cobaye est massé doucement pendant cinq minutes, puis l'exsudat péritonéal est aspiré dans la seringue. Les animaux sains ainsi traités sont susceptibles d'être utilisés à nouveau, après six à huit semaines de repos, pour un prélèvement ultérieur de monocytes, ou pour d'autres expériences.

c) Préparation de la suspension des monocytes : L'exsudat aspiré est centrifugé pendant cinq minutes à 500 t.m. Le liquide surnageant est rejeté. Les cellules sont mises en suspension dans 10 cm³ de milieu nutritif et dénombrées. La suspension est divisée en deux parties égales, dont l'une sert de témoin et l'autre est infectée par des bacilles tuberculeux.

La récolte des cellules est de trois millions de cellules environ, dont 90 % sont des monocytes.

2 - Cobayes :

Les cobayes normaux sont testés par injection intradermique d'une forte dose de tuberculine brute, 10 mg. Seuls les animaux présentant une réaction négative sont utilisés comme témoins.

Cobayes tuberculeux

Des cobayes de même poids (400 à 500 g.) sont infectés par 0,001 mg de Myco. tuberculosis de souche H37Rv par voie sous-cutanée, et utilisés après six à huit semaines quand ils réagissent fortement à 5 unités de tuberculine IP 48.

Cobayes vaccinés

Des cobayes sont vaccinés par du B.C.G. (de l'Institut Pasteur) injecté à raison de 5 mg dans 1 cm³ à chaque cobaye par voie sous-cutanée. Ils sont utilisés après six à huit semaines

quand ils réagissent à l'intradermo-réaction tuberculinique.

3 - Désensibilisation des cobayes vaccinés :

On vérifie au préalable que les cobayes vaccinés réagissent positivement à une injection intradermique de 10 mg de tuberculine brute. La désensibilisation est obtenue par des injections intramusculaires quotidiennes de tuberculine brute pendant 15 jours. On utilise des doses croissantes, de 10 mg à 500 mg. On s'assure à la fin du traitement, que tous les animaux présentent une réaction intradermique négative à la tuberculine. La désensibilisation est entretenue par des injections bihebdomadaires de 200 mg de tuberculine.

4 - Bacille tuberculeux.

La souche H37Rv T.C.8 (de l'Institut Pasteur) de *Mycobacterium tuberculosis hominis* a été utilisée dans toutes les expériences. Elle est entretenue sur milieu de Löwenstein. Après une semaine de croissance 10 mg environ sont prélevés à la spatule, et transférés dans un flacon à billes de verre. Quelques gouttes d'eau bidistillée stérile sont ajoutées pour faciliter l'homogénéisation des bacilles. Le flacon est agité à la main pendant 5-10 minutes. 10 cm³ d'eau bidistillée stérile sont ajoutés pour faire une suspension finale de 1 mg/cm³.

La suspension est filtrée deux fois sur le même filtre en papier. Un entonnoir en verre contenant le papier filtre est

adapté à un tube de 22 mm de diamètre à l'aide de coton cardé, et l'ensemble est stérilisé à l'autoclave à 120° C pendant 1/2 heure. Après une première filtration l'entonnoir est transféré sur un autre tube stérile et la suspension est filtrée à nouveau. Après cette double filtration la suspension ne contient que des bacilles isolés à l'exception de quelques rares amas de 3-4 bacilles.

5 - Milieux de croissance.

- a) On utilise du sérum de veau à 20 % dans un milieu contenant de l'hydrolysate de caséine (Lépine et coll. (30). On ajoute du rouge de phénol pour contrôler et pour déceler les changements de pH, ainsi que 50 unités/cm³ de pénicilline pour éviter les contaminations. Dans quelques expériences on a également ajouté 3 µg/cm³ de streptomycine pour éviter la croissance des bacilles extracellulaires. Pour la phagocytose nous avons utilisé le même milieu, mais sans streptomycine.
- b) Les sérums des cobayes normaux, vaccinés et tuberculeux sont utilisés à la concentration de 40 % et 80 % dans le milieu de Parker (54). Les concentrations finales de pénicilline et streptomycine sont respectivement de 50 unités/cm³ et 3 µg/cm³.

6 - Phagocytose.

La suspension de bacilles est ajoutée à la suspension de

monocytes en milieu nutritif d'hydrolysate de caséine au sérum de veau à 20 % (sans streptomycine) dans un tube à centrifuger. Le tube est agité et placé à l'étuve à 37° C pendant une heure. La suspension est mélangée doucement toutes les dix ou quinze minutes. Après une heure la suspension est centrifugée pendant deux minutes à 500 t.m. Le liquide est complètement enlevé par aspiration à la pipette à boule pour éliminer tous les bacilles non phagocytés.

Le culot est remis en suspension dans le milieu nutritif et distribué dans les tubes de culture de tissu; ceux-ci ont 15 mm de diamètre, 15 cm de longueur et une surface plane au niveau des derniers 3,5 cm pour recevoir une lamelle (32 mm x 11 mm). Les tubes sont bouchés avec des bouchons en caoutchouc et laissés à l'étuve en position couchée. Les cellules se déposent sur la surface supérieure de la lamelle et se fixent.

Après deux heures à l'étuve à 37° C, les tubes sont retirés et agités doucement pour remettre en suspension les cellules non fixées sur la lamelle. Le milieu contenant les cellules non fixées est enlevé stérilement avec une pipette à boule. On ajoute de nouveau 1,5 cm³ de milieu à chaque tube et les tubes sont remis à l'étuve en position couchée. On peut ainsi éliminer les globules rouges et les cellules autres que les monocytes, qui ne s'attachent pas au verre.

7 - Culture

Les tubes restent couchés à l'étuve. La coloration est faite après 1, 4 et 7 jours d'incubation. Le milieu est renouvelé le 4ème jour.

8 - Coloration

La coloration est faite sur la lamelle dans le tube même. Le milieu est complètement enlevé par aspiration avec une pipette à boule. 0,5 cm³ d'alcool méthylique est ajouté à chaque tube pour fixer la culture. Les tubes sont laissés couchés pour que l'alcool méthylique couvre la lamelle entièrement. Après 15 à 30 minutes de fixation les tubes sont vidés et on lave soigneusement à l'eau de robinet. 4 cm³ de Ziehl (Fuchsine) sont ajoutés dans chaque tube et le tube est légèrement chauffé jusqu'à émission de vapeur, trois fois pendant dix minutes.

Les cultures sont différenciées par l'alcool chlorhydrique à 0,5 % jusqu'à disparition de la teinte rouge. Les préparations sont recolorées par le liquide Giemsa R (15 gouttes par 10 cm³ d'eau distillée) pendant 10 minutes.

Les lamelles sont retirées des tubes après coloration, et sont montées au baume du Canada sur les lames après des passages rapides dans l'alcool absolu et toluène.

Pour les études sur l'allergie les cellules n'étaient pas colorées par le Ziehl et le Giemsa mais par l'hémalum-Eosine pour étudier la cellule.

III - COMPORTEMENT DES CELLULES EN CULTURE

Avec la technique décrite on n'obtient que des monocytes dans la culture. L'exsudat péritonéal du cobaye contient déjà approximativement 90 % de monocytes. Après deux heures d'étuve les monocytes adhèrent très fermement sur le verre. Un lavage de la culture à ce moment avec une agitation douce enlève les cellules non adhérentes comme les globules rouges et les polynucléaires et nous obtenons une culture relativement pure de monocytes.

Le deuxième jour, la grande majorité des cellules restées adhérentes au verre, commencent à pousser un ou deux prolongements. La plupart des cellules sont rondes et montrent un noyau avec un ou plusieurs nucléoles. Quelques rares cellules ont plusieurs noyaux; leur contour est arrondi et les noyaux sont à la périphérie, comme dans la cellule géante (fig. 1); la majorité a deux ou trois noyaux et exceptionnellement on peut rencontrer des cellules ayant de 7 à 8 noyaux.

Le cytoplasme de ces cellules est abondant, coloré en bleu pâle par le colorant de Giemsa, et dans la plupart des cellules on trouve des gouttelettes d'huile de paraffine. Celles-ci ne modifient pas le métabolisme des cellules et ne nuisent pas à la croissance intracellulaire du bacille tuberculeux (7).

Dans la majorité des cas, les gouttes d'huile disparaissent vers le cinquième jour de culture, mais parfois on les a observées encore après huit ou dix jours.

Fig. 1 - Aspect de la culture après 1 jour. (Coloration au Giemsa)
Présence de cellules contenant plus d'un noyau.
Gr. 135 fois.

Fig. 2 - Aspect de la culture après 5 jours. (Coloration au Giemsa).
Apparition de cellules épithélioïdes, plus plates,
colorées plus faiblement que les monocytes.
Gr. 135 fois.

Après trois à quatre jours de croissance, les cellules sont très actives et présentent plusieurs prolongements cytoplasmiques, leur taille est accrue.

Après quatre à cinq jours les monocytes sont à l'apogée de leur croissance; les uns ont une forme arrondie, les autres présentent des pseudopodes. Ils se colorent bien par le Giemsa : le noyau est violet et le cytoplasme bleu-pâle.

On trouve aussi une autre variété de cellules, elles sont hexagonales, rangées en dalles ou ont des formes irrégulières. Elles sont plates en comparaison des monocytes déjà décrits. Elles se colorent très faiblement avec le Giemsa uniformément en bleu pâle (fig. 2). Elles peuvent être des cellules mésothéliales (décrites par plusieurs auteurs 1, 40, 68). Mais ces cellules ressemblent à celles de la souche de l'exsudat péritonéal du lapin (Le Quan Sang et Maurin (31)). Selon ces auteurs elles peuvent être d'origine épithélioïde. Elles paraissent avoir les mêmes propriétés que les monocytes : phagocytose et croissance intracellulaire des bacilles.

Elles deviennent plus apparentes le cinquième jour et quelquefois même dès le troisième jour. Leur croissance sera alors très rapide, elles déplacent les monocytes et quelquefois envahissent toute la lamelle ainsi que les côtés du tube de culture. Nous n'avons pas cherché à évaluer la croissance des bacilles dans ces cellules, mais il serait intéressant de connaître celle-ci de même que les réactions allergiques. Ainsi on pourrait étudier la transmission de l'allergie et de l'immunité cellulaires aux générations

suivantes des cellules, et aussi le rôle de ces cellules épithéliales (d'après Le Quan Sang et Maurin (31) dans le concept de l'immunité cellulaire vis-à-vis des monocytes. Nous avons essayé de préparer une souche cellulaire à partir de l'exsudat péritonéal du cobaye, mais les cellules meurent après la deuxième ou la troisième trypsination.

Les monocytes continuent à augmenter de taille, mais nous n'avons pas observé de multiplication. L'avantage qu'on a à les utiliser consiste dans le fait qu'on peut les conserver pendant 10 à 12 jours après le prélèvement, qu'ils sont un excellent milieu de culture pour le bacille tuberculeux et aussi qu'ils permettent d'étudier l'immunité cellulaire.

Nous avons vu que les cellules qui sont en haut de la lamelle sont plus grandes que celles qui sont au fond du tube. Elles sont aussi plus rondes et montrent moins de pseudopodes. Comme les tubes sont inclinés très légèrement (approximativement 5°) les cellules du haut sont recouvertes par moins de milieu et sont mieux aérées ce qui explique peut être la différence d'aspect.

IV - ETUDE DES FACTEURS HUMORAUX

Depuis le début de ce siècle les chercheurs se sont intéressés au mécanisme exact de l'immunité dans la tuberculose. Dans les maladies infectieuses aiguës, le problème a été vite résolu par la découverte de la production d'anticorps dans le sang qui neutralisent l'antigène. L'ère de la vaccination était venue et on a trouvé aussi un vaccin contre la tuberculose qui protège contre l'infection. Comment le vaccin agit-il dans ce cas? Par production d'anticorps neutralisants comme dans d'autres maladies infectieuses ou par hypersensibilisation des tissus ou par un autre mécanisme.

On a suivi pour étudier cette question deux voies d'investigations différentes. La première consiste à rechercher s'il existe un facteur d'immunité dans le sang, ou facteur humoral, la seconde à étudier si les tissus eux-mêmes sont modifiés d'une façon quelconque.

Facteur humoral :

Plusieurs techniques ont été employées. La plus fréquente consistait à produire une immunité passive par injections répétées de sérums immuns aux animaux tuberculisés. Toutes les expériences montraient que dans la tuberculose, les anticorps n'arrivaient pas à modifier la maladie.

Lurie (34, 35) mit le même nombre de bacilles tuberculeux dans des petits blocs de gélose et les implanta dans le tissu sous-cutané des cobayes normaux et des cobayes vaccinés par le B.C.G. Ainsi les

humeurs pouvaient entrer dans les blocs de gélose mais les bacilles ne pouvaient pas passer en dehors. Puis après un à 30 jours, les blocs étaient sortis et repiqués sur milieu de Löwenstein. Il constata que la croissance du bacille tuberculeux était inhibée dans les blocs qui étaient implantés chez les cobayes immuns. Donc il conclut que les sérums immuns inhibent la croissance du B.K.

Raffel (58) répéta ces expériences et au lieu de blocs de gélose, utilisa des capsules de plastique ayant une fenêtre ou membrane gradocol qui permet le passage des particules de 60-70 mμ; le bacille tuberculeux ne peut pas passer à l'extérieur et les macrophages ne peuvent pas entrer à l'intérieur, les capsules permettant seulement le passage des humeurs. Il ne trouva aucun effet inhibiteur des sérums immuns sur la croissance du B.K. Il essaya aussi, sans succès, de produire une immunité passive, en injectant 2 cm³ de sérum immun tous les jours pendant deux mois aux cobayes après les avoir tuberculisés.

Fong et coll. (18) ont traité cette question très différemment. Ils ont étudié la dégénérescence de monocytes infectés en présence de divers sérums. Ils constatent qu'il y a très peu de dégénérescence de monocytes infectés par le bacille tuberculeux en présence de sérums immuns. Suter (68-70) mit les sérums directement dans les cultures de monocytes infectés et ne constata aucune modification de la croissance du bacille tuberculeux intracellulaire. Sho Abe (1,2) cultiva les bacilles tuberculeux dans un milieu contenant 50 % de sérum immun et démontra l'inhibition de la croissance du bacille tuberculeux sans cellules.

Protocole des expériences

Pour étudier l'action des sérums immuns nous avons infecté, avec la souche H37Rv, des monocytes provenant de cobayes normaux et nous avons ajouté dans le milieu nutritif des sérums normaux ou immuns aux concentrations de 40 % et 80 %.

Pour obtenir le sérum nous prenons le sang de cobayes normaux et vaccinés, par ponction intracardiaque. Nous utilisons un mélange de sérums provenant des cobayes différents. Avant de les utiliser nous avons fait les examens sérologiques, des sérums mélangés, par la méthode de Middlebrook et Dubos (50). L'antigène est représenté par la fraction polysidique de la tuberculine purifiée IP48.

Technique :

La réaction consiste à mettre des dilutions croissantes de sérum en présence d'hématies sensibilisées par l'antigène. Les sérums à examiner sont dilués à parties égales avec de l'eau physiologique et sont chauffés pendant 30 minutes à 56° C dans un bain-marie. Puis le sérum dilué inactivé est saturé deux fois avec des globules de mouton. A 2 cm³ de sérum dilué inactivé on ajoute après refroidissement 0,2 cm³ du culot de globules de mouton. Après 20 minutes de contact avec agitations fréquentes, le sérum est centrifugé et décanté. On recommence dans les mêmes conditions une deuxième saturation. Le sérum est alors prêt à être utilisé.

Pour la préparation des hématies on fait séjourner 2 heures au

bain-marie à 37° C et en agitant toutes les 15 minutes, la suspension qu'on obtient en ajoutant 0,2 cm³ d'antigène (fraction polysidique de l'IP48 préparée à l'Institut Pasteur). Au sortir du bain-marie les globules sont lavés trois fois dans 20 à 30 cm³ d'eau physiologique. Une suspension de ces hématies est préparée dans 40 cm³ d'eau physiologique de même qu'une suspension d'hématies non sensibilisées servant de témoin.

TABLEAU I

Réaction d'hémagglutination de
Middlebrook et Dubos

La réaction :

	Témoin antigène	Témoin sérum	Taux de dilution du sérum							
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	
Sérum dilué à 1/2	-	0,4	0,4	0,4	-	-	-	-	-	
Eau physiologique	0,4	-	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
Quantité prélevée sur le tube précédent	-	-	-	-	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4 jeté
Globules rouges sensibilisés	0,4		0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	
Globules rouges non sensibilisés	-	0,4	-	-	-	-	-	-	-	

Le résultat est exprimé par la plus grande dilution de sérum qui provoque l'hémagglutination.

Nos résultats étaient :

Sérums normaux mélangés	Pas d'hémagglutination dans tous les tubes
-------------------------	--

Sérums immuns mélangés	Hémagglutination jusqu'à 1/16
------------------------	-------------------------------

Chez le cobaye le titre de 1/16 est considéré comme positif.

Il y a des variations individuelles mais le mélange des sérums immuns donne généralement ce titre. Les sérums des cobayes normaux sont toujours négatifs.

Nous avons utilisé les concentrations les plus élevées de sérums pour avoir une forte concentration d'anticorps, ou de facteur sérique contenu dans le sérum immun.

Pendant toutes nos expériences sauf une série (chap. V) nous avons infecté les cellules par une faible dose bacillaire. Les bacilles ont été phagocytés par 10 à 20 p.100 des cellules. Généralement nous avons obtenu 1 ou 2 bacilles par cellule infectée, et rarement des amas de plus de 2-3 bacilles intracellulaires au départ. Aux 1er, 4ème et 7ème jours, on a procédé à des numérations sur les cultures après coloration. Notre but est d'étudier la vitesse de croissance intracellulaire du bacille tuberculeux.

Pour juger le niveau de croissance nous avons dénombré à peu près 500-700 monocytes dans chaque préparation et nous comptons le nombre de bacilles dans les monocytes infectés. Les numérations ont été faites en trois endroits différents de la lamelle. Nous



comptons approximativement



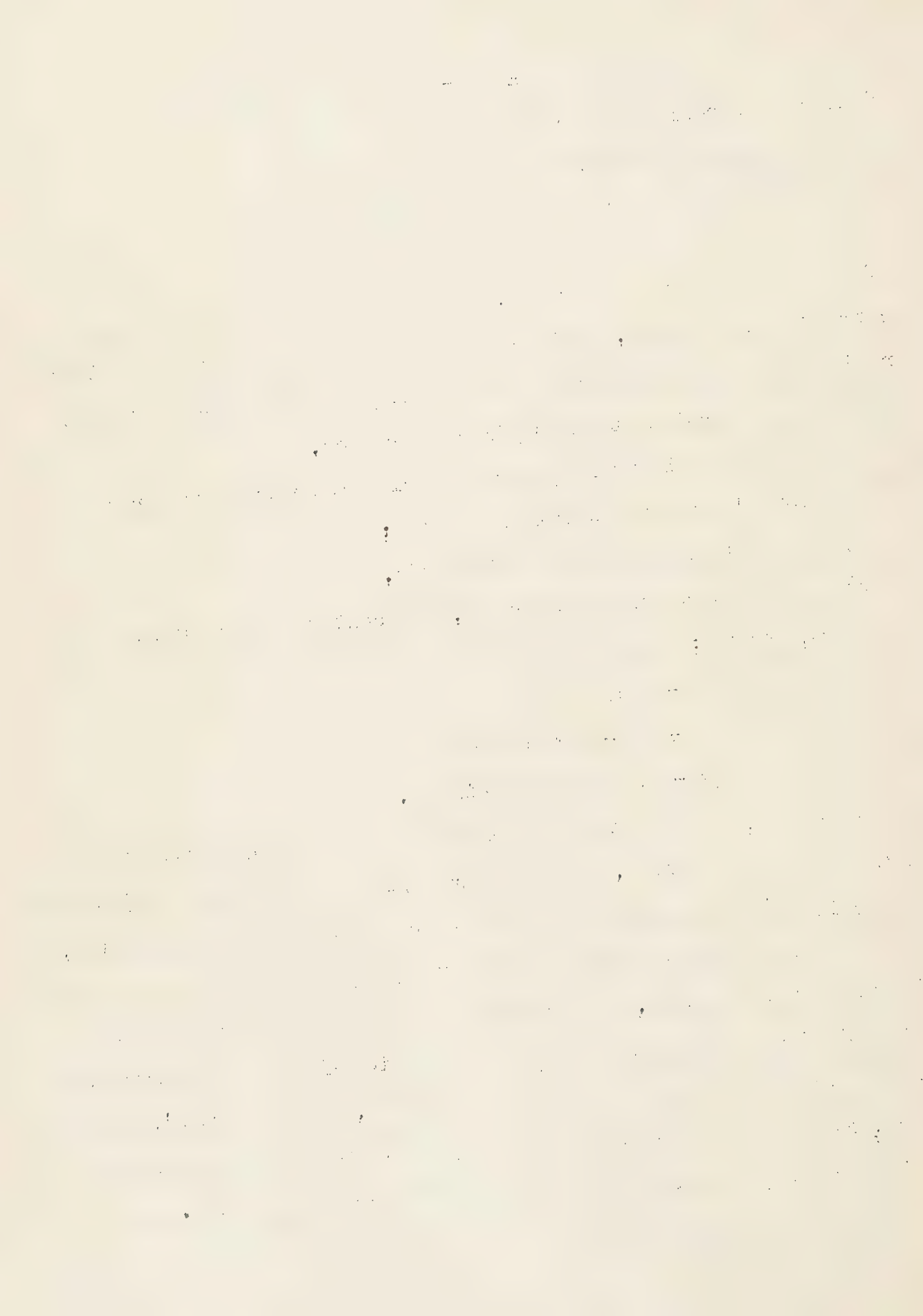
200 cellules de chaque groupe, ainsi toute la lamelle est assez correctement évaluée. Puis à la fin nous regardons toute la lamelle rapidement pour être sûr que les moyennes que nous avons établies sont bien réparties sur toute la préparation.

Dans les tableaux nous avons exprimé les résultats après numération d'après la formule suivante :

- a) Pourcentage de monocytes infectés.
- b) Parmi les cellules infectées, pourcentage des cellules contenant :

- I - 1-2 bacilles
- II - 3-10 bacilles
- III - Plus de 10 bacilles.

A la fin, nous avons fait les moyennes de ces chiffres et avons établi une courbe. Cette courbe donne le nombre approximatif de bacilles intracellulaires dans une population de 1000 monocytes, et le total est obtenu en additionnant le nombre des bacilles de différentes catégories. Ainsi nous considérons les bacilles de catégorie 1-2 comme un bacille, de catégorie 3-10 comme 5 bacilles et de catégorie plus de 10 comme 10 bacilles. Ce chiffre n'est pas exact, il est tout à fait relatif mais nous donne une idée de croissance relative de bacilles dans les diverses cellules.



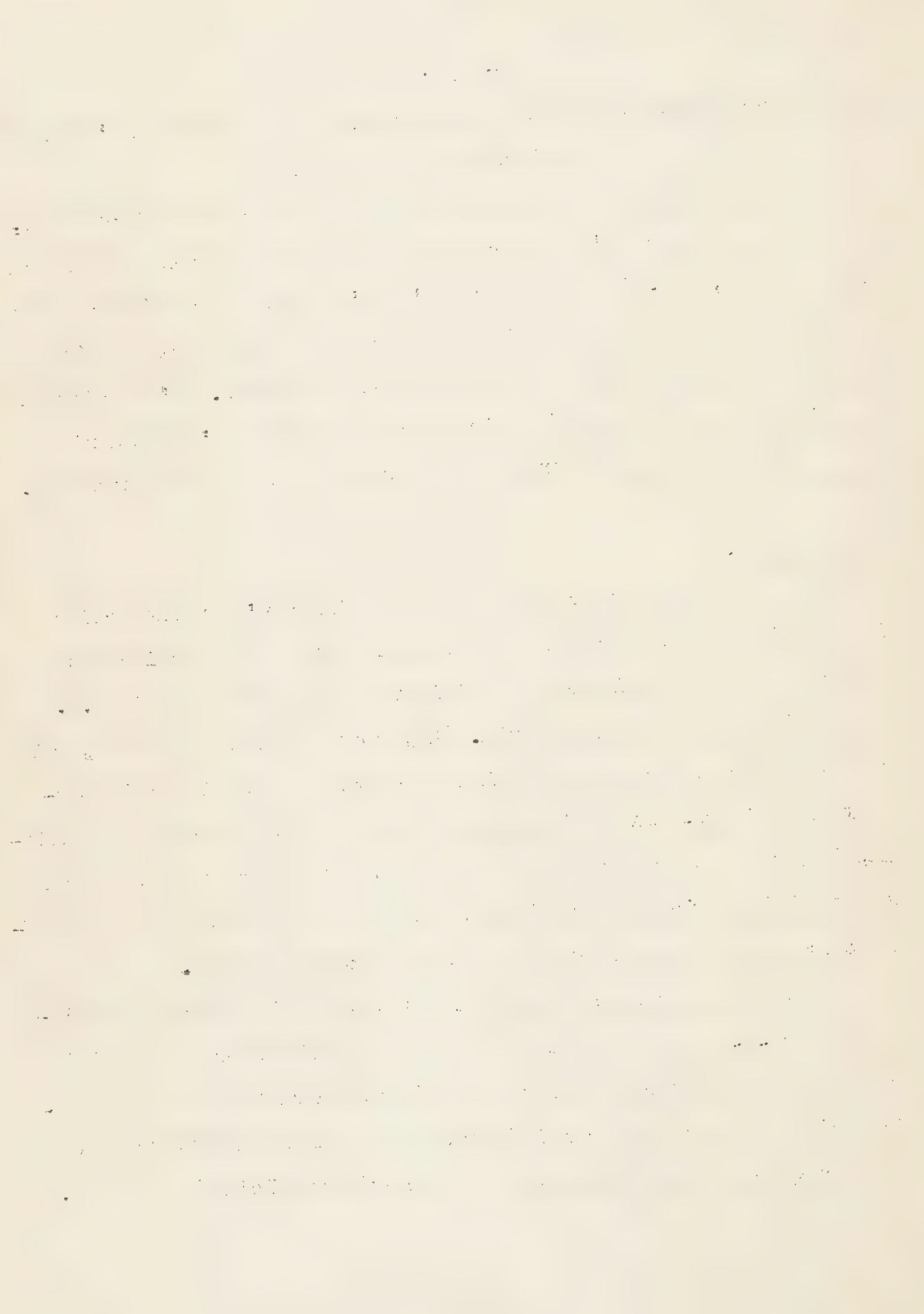
ACTION DES SERUMS IMMUNS SUR LA CROISSANCE DE BACILLES A L'INTERIEUR
DE CELLULES NORMALES.

Les numérations des bacilles dans les monocytes effectuées 1, 4 et 7 jours après l'ensemencement dans les deux séries de cultures (Tableau II, fig. 3) ont montré qu'il n'y a pas de différence entre la croissance des bacilles intracellulaires en présence de sérum immun ou normal en plus ou moins grandes quantités. C'est ainsi que la présence de 80 % de sérum immun dans le milieu n'empêche ni ne ralentit la multiplication de bacilles dans les cellules normales.

Discussion :

Nos résultats montrent que le sérum immun n'a aucune action inhibitrice sur le bacille tuberculeux. Suter (68) aussi avait montré que le sérum immun ne modifiait pas la croissance du B.K. Les expériences de Fong et coll. (18) sont très intéressantes, mais ces auteurs ont seulement suivi la culture de tissu infectée pendant deux jours. Avec l'infection massive de 10 bacilles par cellule, il y a un choc sur les monocytes après un jour et la culture ne se stabilise qu'après deux jours. De plus ils ont étudié la dégénérescence des monocytes et non la croissance du bacille.

Dans les expériences de Shô Abe (1,2) la différence de croissance du B.K. dans les cellules normales cultivées dans les milieux contenant des sérums immuns ou des sérums normaux est négligeable. Le bacille tuberculeux cultivé seul sans cellules adhère très peu au verre, une étude semblable est donc très difficile à réaliser.



TABLÉAU II - Taux de multiplication de bacilles tuberculeux intracellulaires, dans les monocytes provenant des cobayes normaux. L'effet de sérums immuns 40 % et 80 %.

Sérum de veau 20 %				Sérum de cobaye normal 40 %				Sérum de cobaye immunité 40 %			
a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
15	95	5	-	15	95	5	-	15	95	5	-
20	45	50	3	18	45	52	3	18	40	57	3
20	6	45	49	20	5	50	45	20	10	45	45
15	92	8	-	15	92	8	-	15	92	8	-
17	45	50	5	20	40	58	2	20	43	55	2
20	10	30	60	20	12	40	48	20	5	52	43
15	90	10	-	15	90	10	-	15	90	10	-
15	26	68	6	16	45	55	-	14	45	50	5
17	10	40	50	15	10	35	55	18	7	40	53

a. Pourcentage de monocytes infectés

b. Parmi les cellules infectées, pourcentage des cellules contenant : 1-2 bacilles, 3-10 bacilles et plus de 10 bacilles.

Sérum de cobaye normal 80 %				Sérum de cobaye immunité 80 %			
a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
15	95	5	-	15	95	5	-
11	45	55	-	12	40	60	-
15	10	50	40	16	15	42	53
15	92	8	-	15	92	8	-
18	44	52	4	15	35	63	2
20	6	42	52	17	12	53	35
15	90	10	-	15	90	10	-
15	43	52	5	18	42	52	6
15	10	43	47	18	10	50	40

Nombre de bacilles dans une population de 1000 monocytes



Fig. 3

Effet de sérums immuns sur la
croissance de bacilles tuberculeux
intracellulaires de cellules normales

Légende

cellules normales o
cellules normales en sérum immuni △
cellules normales en sérum normal ◎

Les expériences très soigneusement faites par Lurie sont difficilement contestables, mais Raffel (58) n'a pas pu refaire les mêmes expériences en utilisant une capsule de plastique qui, de toute façon est plus imperméable aux bacilles tuberculeux que des blocs de gélose. Et puis dans l'organisme intact il y a d'autres mécanismes, encore inconnus, qui peuvent jouer un rôle dans la protection contre la tuberculose.

Résumé :

Des concentrations variables de sérums immuns, allant jusqu'à 80 % de sérum dans le milieu de culture, n'ont pas modifié la croissance du bacille tuberculeux dans les cellules normales.

V - FACTEURS CELLULAIRES

L'échec auquel ont été voués tous les essais faits pour prouver le rôle des anticorps dans l'immunité au cours de la tuberculose a attiré l'attention de plusieurs chercheurs sur l'existence possible d'un facteur cellulaire. Rich et Lewis (61) ont montré la persistance de l'allergie dans les monocytes hors de l'organisme. Lurie (36,37) infecta les monocytes provenant de l'exsudat péritonéal des lapins normaux et immuns, et les injecta dans la chambre antérieure de l'oeil de lapins normaux. Dix à quatorze jours plus tard, il sacrifia les lapins et mit en culture sur milieu de Löwenstein, le liquide de la chambre antérieure et l'iris broyé. En comptant le nombre de colonies il a pu montrer une action inhibitrice des monocytes immuns sur la croissance du bacille tuberculeux.

Peu après Chase (10) a transféré passivement l'allergie aux cobayes normaux en injectant par voie intrapéritonéale des monocytes allergiques.

Ces études ont incité d'autres chercheurs à reproduire ces observations en procédant par cultures de tissu. Suter (68) utilisant les cultures cellulaires de lapins, put observer un effet inhibiteur des monocytes immuns, allergiques ou désensibilisés, sur la croissance du bacille tuberculeux. En même temps Mackaness n'a trouvé aucune différence de croissance du bacille tuberculeux dans les cellules normales et immunisées.

Shô Abe (1, 2) et Berthrong et Hamilton (7) ont montré l'inhibition des bacilles tuberculeux par les monocytes vaccinés. Or

Berthrong et Hamilton stipulent que l'inhibition de croissance chez des cellules immunes peut être due à une réaction allergique qui se produit entre la cellule immunisée et le bacille tuberculeux. Celui-ci modifie la cellule permettant ainsi à la streptomycine (mise pour éviter la croissance extracellulaire du B.K.) de traverser la membrane cellulaire. Ces auteurs ont aussi trouvé qu'on n'observe pas d'inhibition importante chez les cellules immunisées et désensibilisées.

Fong et coll., (18) ont montré que les monocytes des lapins immuns se conservent mieux que les monocytes normaux si on soumet les uns et les autres à une infection massive de bacilles tuberculeux.

Les travaux faits jusqu'ici sont discordants mais une majorité de chercheurs attribue la cause de l'immunité aux tissus mêmes. Nous avons repris l'étude de la culture des bacilles tuberculeux dans les monocytes des cobayes normaux, des cobayes vaccinés et (dans quelques expériences) des cobayes tuberculeux, pour chercher à éclaircir ce sujet. La technique utilisée était un peu différente de celle des auteurs précédents, bien que dans ses grandes lignes, elle soit restée la même. Nous avons vérifié le rôle joué par l'immunité cellulaire dans l'inhibition de la croissance des bacilles par les cellules vaccinées.

Nous avons également comparé le rôle dû à l'adjonction de la streptomycine au milieu de culture en faisant deux lots pour chaque série d'expériences, une sans et l'autre avec streptomycine au taux de 3 γ /cm³.

1. The first of the three main branches of the

the second of the three main branches of the

the third of the three main branches of the

the fourth of the three main branches of the

the fifth of the three main branches of the

the sixth of the three main branches of the

the seventh of the three main branches of the

the eighth of the three main branches of the

the ninth of the three main branches of the

the tenth of the three main branches of the

the eleventh of the three main branches of the

the twelfth of the three main branches of the

the thirteenth of the three main branches of the

the fourteenth of the three main branches of the

the fifteenth of the three main branches of the

the sixteenth of the three main branches of the

the seventeenth of the three main branches of the

the eighteenth of the three main branches of the

the nineteenth of the three main branches of the

the twentieth of the three main branches of the

the twenty-first of the three main branches of the

the twenty-second of the three main branches of the

the twenty-third of the three main branches of the

the twenty-fourth of the three main branches of the

the twenty-fifth of the three main branches of the

the twenty-sixth of the three main branches of the

Partie expérimentale

a) Infection massive :

Nous avons commencé par une série d'expériences caractérisées par une infection massive des cultures de tissu. Dans celles-ci approximativement 70 % à 80 % des monocytes ont phagocuté les bacilles au départ. Nous avons étudié des monocytes provenant de cobayes normaux, de cobayes vaccinés par le B.C.G. et de cobayes tuberculeux. Le milieu nutritif était l'hydrolysate de caséine enrichi de sérum de veau à 20 % et additionné ou non de streptomycine à 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Nous avons dénombré d'une part le nombre de monocytes infectés et d'autre part le nombre de bacilles qui infectaient ceux-ci. Pour des raisons de commodité d'exposition, les monocytes ont été classés en trois groupes selon qu'ils contenaient chacun soit de 1-2 bacilles, soit de 3-10 bacilles, soit plus de 10 bacilles.

Multiplication de bacilles :

La croissance de bacilles est rapide avec une infection massive. Les cellules infectées se portent normalement et ne sont pas détruites par les bacilles. Nous avons vu les cultures dont toutes les cellules renfermaient les B.K. en grandes quantités et les cellules étaient normales (fig. 4). Quand le nombre de bacilles était très grand, la masse bacillaire peut faire éclater la cellule (fig. 4 et 5). Si la multiplication bacillaire continue, toutes les cellules qui ont phagocyté les

Fig. 4 - Aspect de la culture après 4 jours. Coloré par Ziehl et Giemsa.

Infection massive : Presque toutes les cellules renferment des B.K. Une cellule (A) en train d'éclater.
Gr. 260 fois.

Fig. 5 - Aspect de la culture après 7 jours. (Coloration Ziehl-Giemsa).

Infection massive : une cellule éclatée par les nombreux bacilles.
Gr. 520 fois.



bacilles meurent 10 à 11 jours après. A ce moment la culture cellulaire est détruite par les bacilles et on n'observe que des agglomérations bacillaires.

Effet de la streptomycine :

En présence de la streptomycine, à raison de 3 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ de milieu, mise pour éviter la multiplication extracellulaire des bacilles (libérés après éclatement de cellules infectées), nous avons vu une diminution du taux de multiplication, cette diminution est encore plus importante dans les cellules vaccinées et tuberculeuses.

A première vue il peut paraître que conformément à l'hypothèse de Berthrong et Hamilton la streptomycine a pénétré à l'intérieur de monocytes vaccinés et tuberculeux grâce à une action allergique provoquée au moment de la phagocytose par l'action du bacille tuberculeux sur la membrane cellulaire.

On peut aussi supposer qu'en présence de la streptomycine la croissance intracellulaire continue et que par conséquent, les bacilles qui sont libérés après l'éclatement des cellules ne peuvent plus se multiplier par voie extracellulaire. Lorsqu'ils sont à nouveau phagocytés ils ne se multiplient plus à l'intérieur de monocytes. Il en résulte une modification des rapports entre les diverses populations bacillaires. La multiplication moindre des bacilles dans les cellules vaccinées ou tuberculeuses peut être due à une combinaison de ces facteurs et du pouvoir inhibiteur naturel de ces cellules.

TABLEAU III - Infection massive des cellules. Effet de l'addition de streptomycine au milieu.

CELLULES NORMALES								CELLULES VACCINEES								CELLULES TUBERCULEUSES							
Sérum de veau 20 %:id. + streptomycine								Sérum de veau 20 %:id. + streptomycine								Sérum de veau 20 %:id. + streptomycine							
a	b			a	b			a	b			a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
75	40	50	10	75	40	50	10	80	35	60	5	80	35	60	5	70	45	50	5	70	45	50	5
85	5	55	40	80	10	40	50	85	-	60	40	80	25	55	20	80	20	30	50	70	10	60	30
98	-	-	100	80	2	30	68	90	-	10	90	85	10	50	40	85	-	-	100	78	-	60	40
Degenerescence complète de cellules				90	-	10	90	Degenerescence complète des cellules				85	5	30	65	Degenerescence complète des cellules				85	5	35	60
70	55	35	10	70	55	35	10	75	50	40	10	75	50	40	10	75	55	30	15	75	55	30	15
80	15	30	55	80	15	40	45	80	25	35	40	75	20	40	40	85	-	40	60	80	10	45	45
90	-	10	90	85	-	40	60	85	-	20	80	80	5	40	55	90	-	-	100	85	5	22	68
60	60	30	10	60	60	30	10	60	70	25	5	60	70	25	5	Pas fait							
63	10	54	36	65	10	48	48	62	10	40	50	65	15	45	40								
70	-	24	76	65	10	30	60	70	8	30	62	70	18	32	50								

a. Pourcentage de monocytes infectés

b. Parmi les cellules infectées, pourcentage des cellules contenant : 1-2 bacilles, 3-10 bacilles et plus de 10 bacilles.

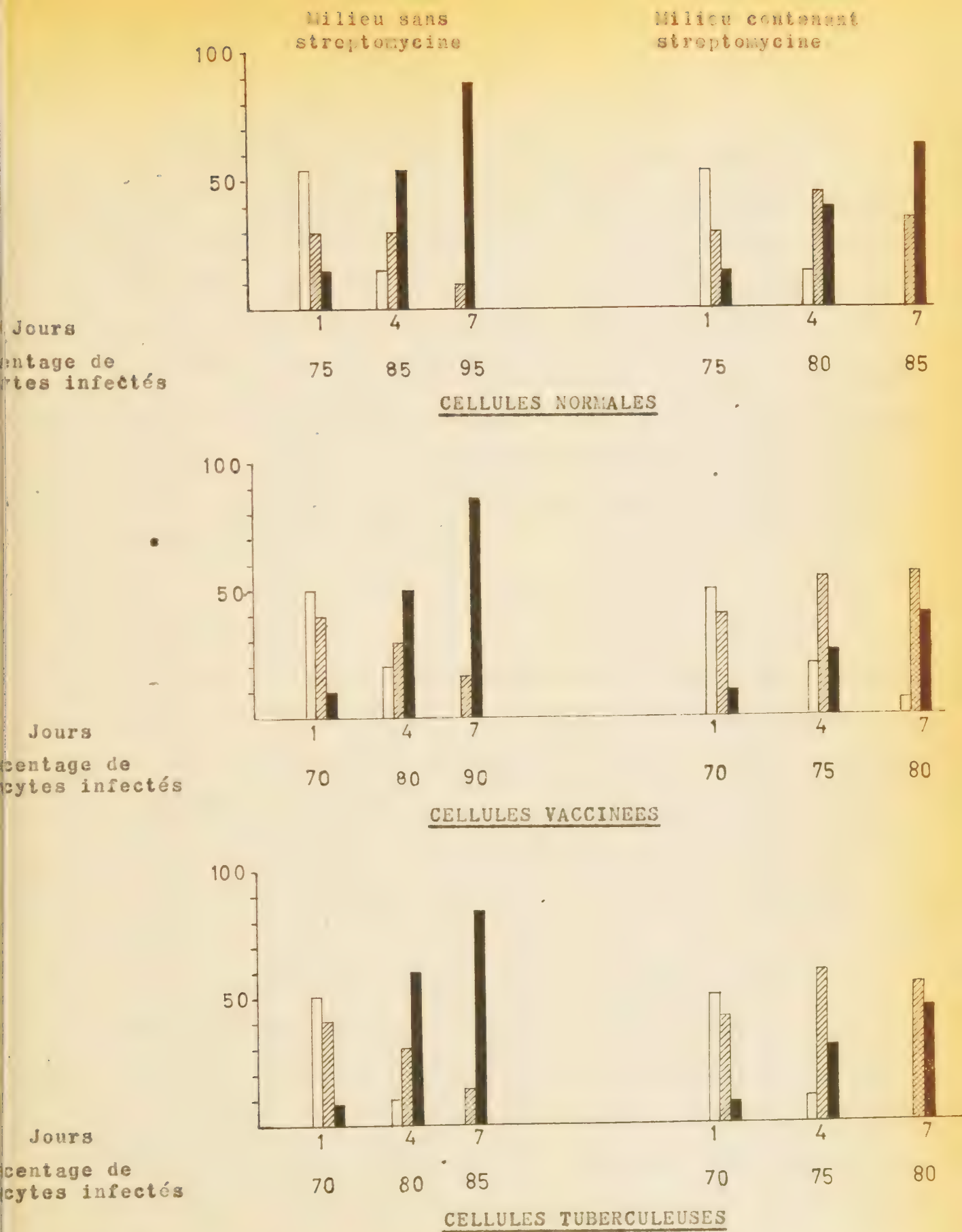


Fig. 6

infection massive des cellules

1-2 bacille par cellule
3-10 bacilles par cellule
>10 bacilles par cellule

Ainsi donc les infections faites à doses massives risquent d'entraîner de fausses interprétations. Aussi avons-nous décidé de ne pas continuer ces expériences, car premièrement une infection aussi grave chez des animaux vaccinés ne leur aurait pas permis de résister, et deuxièmement il est très difficile de faire des numérations bacillaires sur ces cultures. Par exemple nous sommes obligés de mettre tout dans un seul ~~et~~ ^{un} groupe : groupe de plus de 10 bacilles alors qu'il peut y avoir des amas de 15-20 ou 200 ou plus et aussi des cordes, ce qui fausserait les résultats.

b) Infections légères

Par la suite nous avons infecté nos cultures très légèrement, c'est-à-dire de telle façon que seulement 10 à 20 p.100 de cellules aient phagocyté des bacilles. Il est plus facile d'observer la croissance d'une population cellulaire soumise à une telle infection. Les numérations bacillaires ont été faites sur des populations de monocytes de la même façon que celle décrite auparavant.

Au départ nous avons obtenu une population monocytique presque unibacillaire (fig. 7). Ainsi nous avons étudié la multiplication du B.K. à partir d'un seul bacille. Comme nous ne continuons nos observations que pendant sept jours, la croissance n'est jamais avancée au point de pouvoir faire éclater les cellules, et ainsi nous n'avons pas à nous soucier s'il y a ou

non une phagocytose secondaire. Nous avons aussi étudié la croissance des bacilles en présence de streptomycine. Mais avec les infections légères la baisse était minime et était uniforme avec toutes sortes de cellules. En somme, la streptomycine n'a pas modifié la croissance à ce taux parce qu'il n'y avait pas d'éclatement des cellules par des bacilles.

Nous avons représenté les résultats de nos expériences dans le tableau IV. Puis nous avons calculé les moyennes et nous les avons représentées dans la courbe (Fig. 9). Même s'il n'y avait pas d'éclatement de cellules nous avons vu dans la plupart des cas une légère augmentation du nombre de monocytes infectés. Cette augmentation pourrait être due à des cellules éclatées que nous n'avons pas pu observer, ou à la perte de cellules non infectées.

Dans ces conditions expérimentales nous avons régulièrement constaté que la croissance des bacilles tuberculeux est plus lente à l'intérieur de monocytes immuns.

La multiplication bacillaire dans les monocytes d'animaux tuberculeux a la même allure que celle dans les cellules normales (ce que nous avons vérifié dans de nombreuses expériences que nous n'avons pas pu décrire ici).

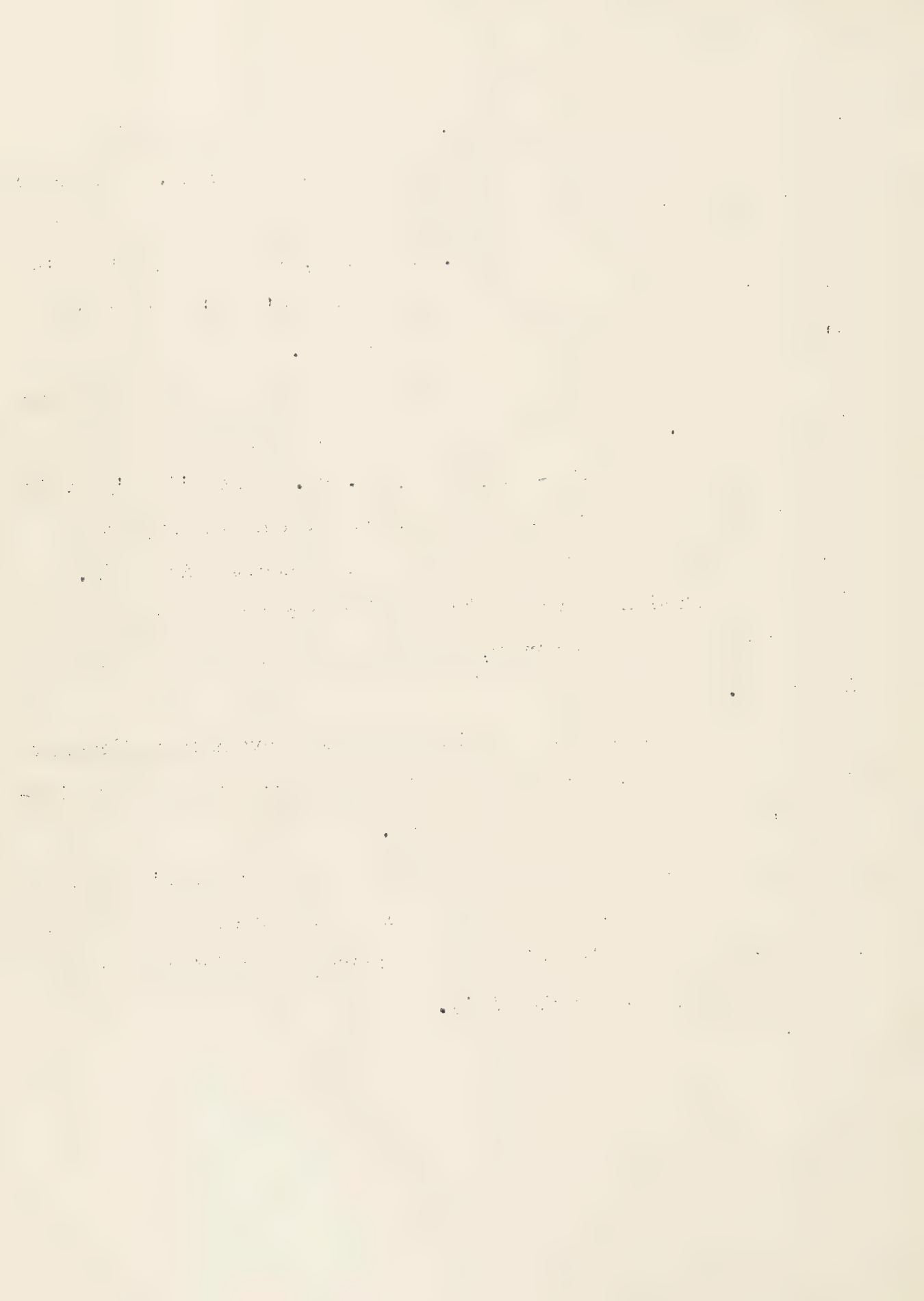


Fig. 7 - Aspect de la culture après 1 jour. Colorée par Ziehl
et Giemsa.
Infection légère, presque unibacillaire.
Gr. 520 fois.

Fig. 8 - Aspect de la culture après 4 jours. Colorée par Ziehl
Giemsa.
Infection légère : Multiplication des bacilles.
Gr. 520 fois.

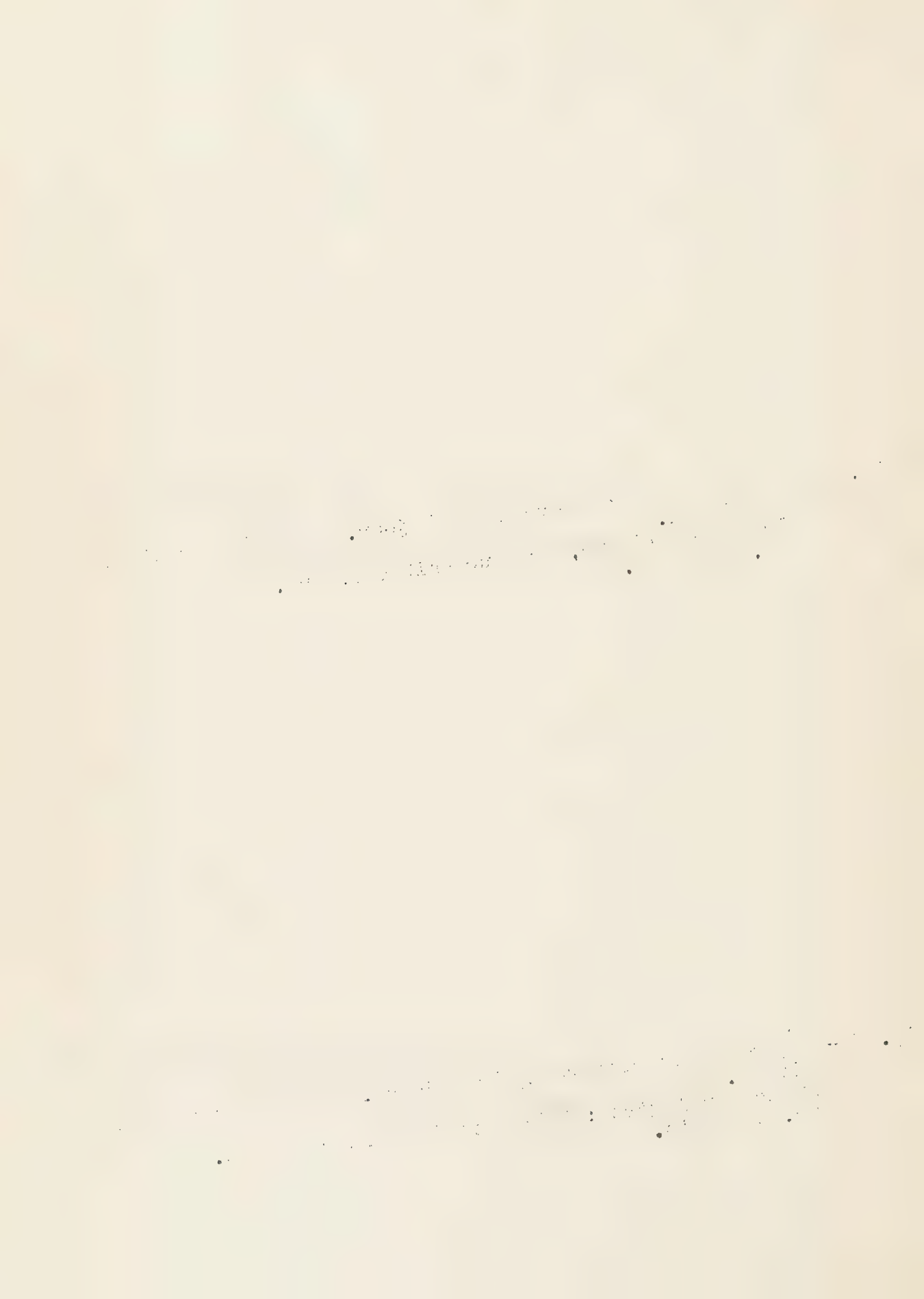


TABLEAU IV - Taux de multiplication de bacilles tuberculeux intracellulaires dans les monocytes normaux, tuberculeux, vaccinés et vaccinés désensibilisés, en milieu contenant sérum de veau à 20 % avec addition ou non de streptomycine.

NORMAUX								TUBERCULEUX							
Sérum bovin 20 %				id.+streptomycine				Sérum bovin 20 %				id.+streptomycine			
a	b			a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
10	90	10	-	10	90	10	-	10	92	8	-	10	92	8	-
20	30	60	10	15	40	55	5	12	55	45	-	10	60	40	-
20	10	50	40	20	10	55	35	18	10	50	40	18	10	54	36
10	95	5	-	10	95	5	-	15	96	4	-	15	96	4	-
15	40	55	5	15	45	55	-	15	40	58	2	15	42	57	1
20	10	30	60	18	20	30	50	20	5	55	40	18	10	60	30
15	92	8	-	15	92	8	-	15	90	10	-	15	90	10	-
18	26	68	6	12	40	55	5	15	30	70	-	16	35	60	5
20	10	40	50	16	8	48	44	20	5	52	43	18	20	40	40

a. Pourcentage de monocytes infectés.

b. Parmi les cellules infectées, pourcentage des cellules contenant : 1-2 bacilles, 3-10 bacilles et plus de 10 bacilles.

VACCINES								VACCINES DESENSIBILISES							
Sérum bovin 20 % : id.+streptomycine								Sérum bovin 20 % : id.+streptomycine							
b			a	b				a	b			a	b		
1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
95	5	-	10	95	5	-	12	12	92	8	-	12	92	8	-
40	58	2	15	50	50	-	14	14	45	53	2	15	45	55	-
10	56	34	15	15	56	29	16	16	14	60	26	15	12	58	30
94	6	-	12	94	6	-	11	11	93	7	-	11	93	7	-
56	44	-	14	76	22	2	13	13	50	50	-	12	47	53	-
10	60	30	16	12	62	26	13	13	18	50	32	10	16	50	34
90	10	-	13	90	10	-	15	15	95	5	-	15	95	5	-
45	55	-	15	50	50	-	15	15	54	46	-	13	58	42	-
15	68	17	15	14	60	26	16	16	15	65	20	15	18	62	20

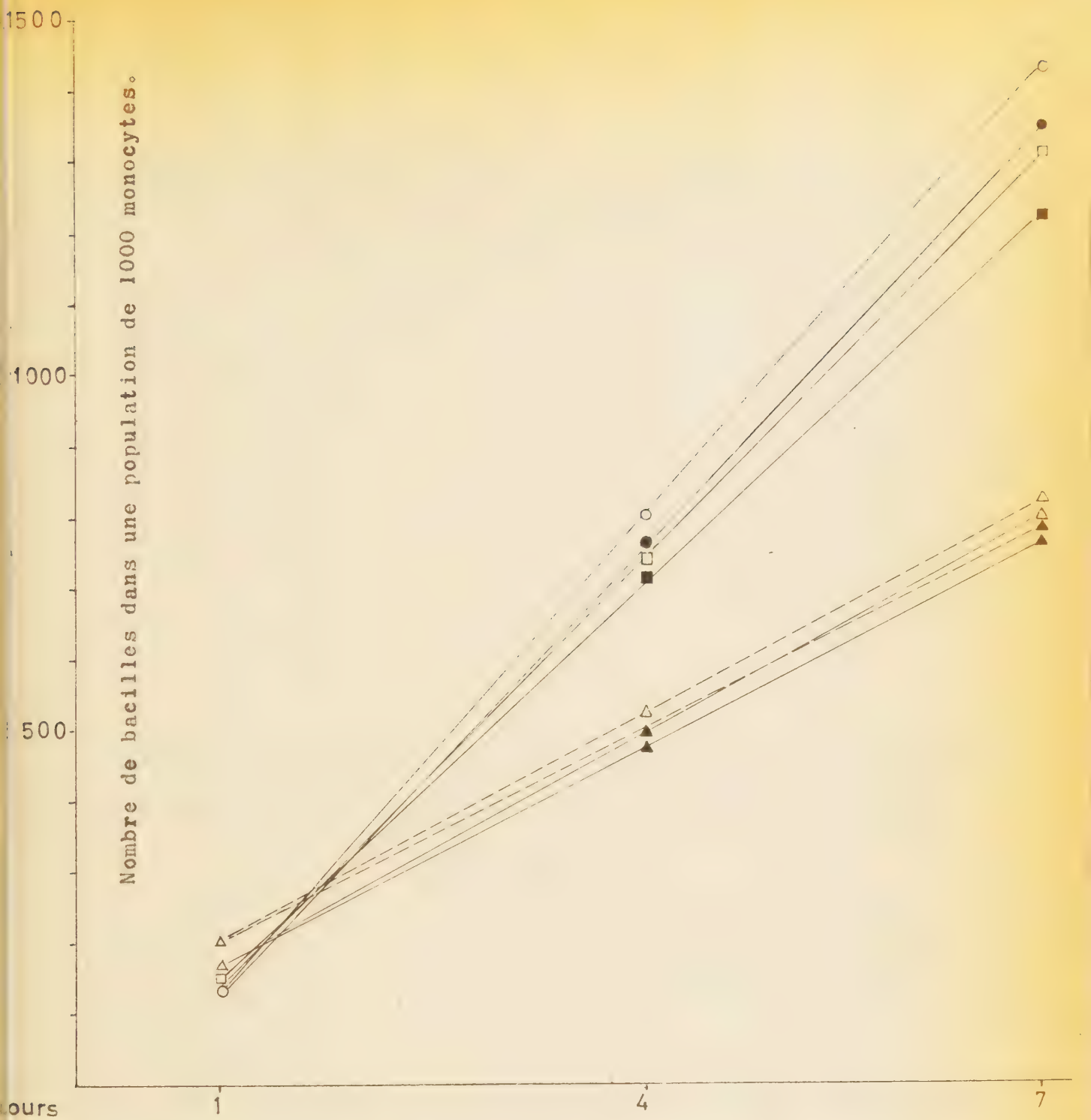


Fig. 9 : Croissance de bacilles dans les monocytes provenant des cobayes vaccinés, tuberculeux et normaux.

Légende : normale o
 Cellule vaccinée Δ
 tuberculeuse □
 désensibilisée --Δ--
 Avec streptomycine symboles pleins

Croissance du bacille tuberculeux dans les monocytes des
cobayes vaccinés désensibilisés.

Les monocytes étaient obtenus des cobayes vaccinés qui étaient désensibilisés par injections de doses croissantes de tuberculine brute. Des études comparables étaient faites avec ou sans streptomycine. L'action inhibitrice de ces cellules sur la croissance du bacille tuberculeux est parallèle à celle des monocytes vaccinés non désensibilisés. L'addition de la tuberculine brute aux cultures cellulaires dans une étude décrite ailleurs (Chap. VII) a permis de vérifier que ces cellules étaient bien désensibilisées.

Croissance du bacille tuberculeux dans les monocytes de cobayes
vaccinés en présence de l'INH à taux de concentrations sous-
bactériostatiques.

Mackaness (40) a montré que la dose bactériostatique de l'INH était $0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ et cela tant pour les bacilles extracellulaires que intracellulaires, car l'INH peut diffuser très facilement dans les cellules.

Nous avons fait des expériences avec des dilutions suivantes de l'INH :

$0,05 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ et $0,005 \mu\text{g}/\text{cm}^3$.

Nous avons vu qu'avec $0,03 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ et les concentrations supérieures, il y a bactériostase complète. A $0,02 \mu\text{g}/\text{cm}^3$, il y a très peu de croissance, mais avec $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^3$ et doses inférieures la croissance des bacilles continue normalement comme chez les

témoins. (Tableau V, fig. 10).

Dans les cellules vaccinées, la multiplication du B.K. est encore ralentie à 0,01 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ mais non à 0,005 $\mu\text{g}/\text{cm}^3$ (tableau Va, fig. 10).



TABLEAU V - Croissance du bacille tuberculeux dans les monocytes provenant des cobayes normaux, en présence de doses sous-bactériostatiques de 1°INH.

CELLULES NORMALES

Sérum de veau 20 %				Milieu contenant 1°INH à 0,05 µg/ml				Milieu contenant 1°INH à 0,03 µg/ml			
a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
10	90	10	-	10	90	10	-	10	90	10	-
20	30	60	10	10	90	10	-	10	90	10	-
20	10	50	40	10	90	10	-	10	90	10	-
10	95	5	-	10	95	5	-	10	95	5	-
15	40	55	5	10	95	5	-	10	95	5	-
20	10	30	60	10	95	5	-	10	95	5	-
15	92	8	-	15	92	8	-	15	92	8	-
18	20	68	6	15	92	8	-	15	92	8	-
20	10	40	50	15	92	8	-	15	92	8	-

Milieu contenant 1°INH à 0,02 µg/ml				Milieu contenant 1°INH à 0,01 µg/ml				Milieu contenant 1°INH à 0,005 µg/ml			
a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
10	90	10	-	10	90	10	-	10	90	10	-
10	90	10	-	15	40	50	10	17	50	50	-
10	70	30	-	18	12	40	48	17	10	43	47
10	95	5	-	10	95	5	-	10	95	5	-
10	90	10	-	12	53	47	-	15	50	44	6
11	65	35	-	18	5	38	57	20	10	40	50
15	92	8	-	15	92	8	-	15	92	8	-
15	92	8	-	15	45	50	5	19	50	50	-
15	60	30	10	17	10	45	45	20	5	40	55

a. Pourcentage de monocytes infectés.

b. Parmi les cellules infectées, pourcentage des cellules contenant : 1-2 bacilles, 3-10 bacilles et plus de 10 bacilles.

TABLEAU Va - Croissance du bacille tuberculeux
dans les monocytes provenant des
cobayes vaccinés, en présence de
doses sous-bactériostatiques de
l'INH.

CELLULES VACCINEES

Milieu au sérum de veau 20 %				Milieu contenant l'INH à 0,05µg/ml				Milieu contenant l'INH à 0,03 µg/ml			
a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
10	95	5	-	10	95	5	-	10	95	5	-
15	40	58	2	10	95	5	-	10	95	5	-
15	10	56	34	10	95	5	-	10	95	5	-
15	90	10	-	15	90	10	-	15	90	10	-
17	56	44	-	15	90	10	-	15	90	10	-
15	10	60	30	15	90	10	-	15	90	10	-
12	94	6	-	12	94	6	-	12	94	6	-
16	35	65	-	12	94	6	-	12	94	6	-
18	10	64	26	12	94	6	-	12	94	6	-

Milieu contenant l'INH 0,02 µg/ml				Milieu contenant l'INH à 0,01 µg/ml				Milieu contenant l'INH à 0,005 µg/ml			
a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
10	95	5	-	10	95	5	-	10	95	5	-
10	90	10	-	12	45	55	-	10	40	56	4
10	60	40	-	15	15	60	25	16	10	60	30
15	90	10	-	15	90	10	-	15	90	10	-
15	85	15	-	15	48	52	-	17	50	45	5
15	70	30	-	14	18	63	19	17	15	58	27
12	94	6	-	12	94	6	-	12	94	6	-
12	80	20	-	13	50	50	-	12	45	55	-
15	60	35	5	13	20	60	20	15	12	58	30

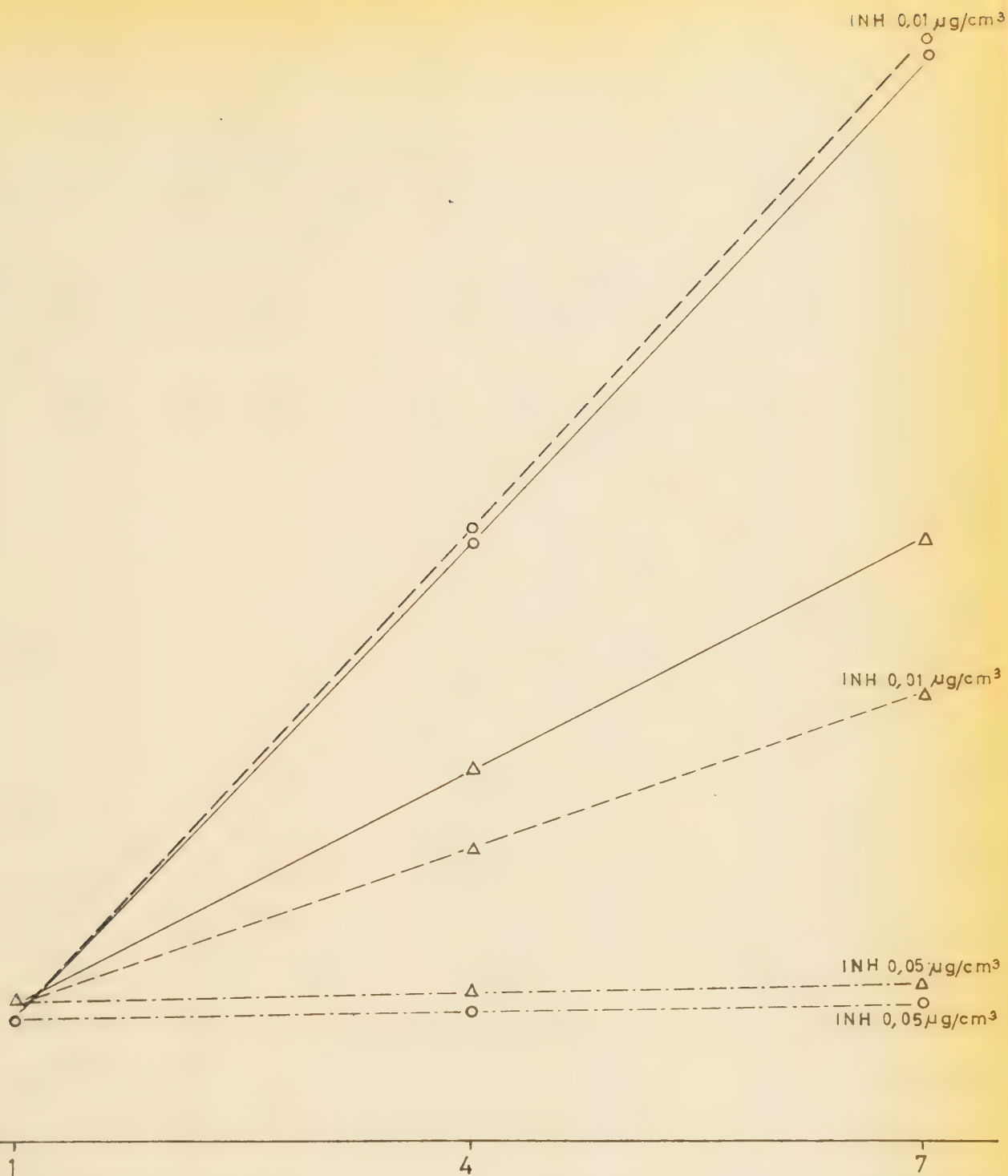


Fig. 10

Effet de l'INH en doses
sousbactérostatique

Légende :

cellules vaccinées : Δ
cellules normales : $\circ$

Discussion :

Pour les études d'immunité il y a des limites à l'emploi des cultures de tissu qui ne peuvent pas remplacer les conditions *in vivo*. Nous avons un nombre fixe de cellules, qui meurent après dix à douze jours en culture, tandis que *in vivo* le terrain est très vaste.

Malgré ces limitations des cultures *in vitro*, nous avons l'avantage de pouvoir observer la multiplication des bacilles pendant quelques jours et d'en tirer des conclusions sur les tendances de la croissance bacillaire dans les cellules diverses.

Nous avons trouvé qu'avec une infection massive il était très difficile d'apercevoir un ralentissement important de la multiplication du bacille tuberculeux à l'intérieur de monocytes immuns. L'interprétation des résultats était très difficile, avec ou sans l'addition de la streptomycine au milieu. Si on n'ajoute pas de streptomycine les bacilles libérés sont phagocytés à nouveau et ils continuent à pousser. Ainsi la population change, et on ne peut pas avoir une idée exacte de l'étendue de la multiplication bacillaire. Si on ajoute de la streptomycine, les bacilles libérés viennent en contact de l'antibiotique. Ils sont ensuite phagocytés et ne poussent plus; la population bacillaire baisse. Pour ces raisons, nous abandonnons la méthode des infections massives de nos cultures pour les études d'immunité.

D'autres chercheurs (7, 43) qui préfèrent l'infection massive présentent une objection à l'emploi de l'infection légère. Ils

disent qu'il y a une réduction de la population bacillaire qui fait qu'il est difficile de tirer des conclusions. Mais dans nos cultures nous avons pu observer une population presque constante. Nos observations sont confirmées aussi par Lê Quan Sang (32). La numération de bacilles était très facile et dans les infections légères l'addition de streptomycine modifiait très peu la croissance bacillaire. La baisse étant minime et uniforme dans toutes les catégories des cellules étudiées, nous avons renoncé à l'usage de streptomycine dans nos expériences ultérieures.

Au niveau cellulaire, d'une façon constante nos essais nous ont permis de constater une inhibition de la croissance des bacilles tuberculeux dans les monocytes provenant de cobayes vaccinés par le B.C.G. Nos études confirment celles de Suter (68) et Sho Abe (1), mais non celles de Mackaness (43) qui utilisa une infection massive.

Nous avons été étonnés de constater que les monocytes provenant des cobayes tuberculeux n'ont ralenti la croissance bacillaire que d'une façon négligeable. Nous nous attendions à ce que leur action soit équivalente à celle des cellules vaccinées, parce qu'ils étaient en contact avec le même antigène in vivo. Le système réticulo-histiocytaire qui est renforcé par l'infection auto-limitée du B.C.G., serait-il épuisé par l'infection progressive de la tuberculose?

Les monocytes provenant de cobayes vaccinés désensibilisés ont réagi de la même façon que ceux des non désensibilisés. Ainsi sont confirmées les études in vivo de Nègre (55), Rich (62), Birkhaug (8) et les études in vitro de Suter (68).

La diminution de la croissance en présence de l'INH à concentration sous-bactériostatique de 0,01 µg/cm³. fait penser que les cellules provenant d'animaux immuns sont altérées et peuvent utiliser l'INH comme un renforçateur. Pourtant dans les études in vitro (sans cellules) le phénomène de synergie n'est pas observé entre l'INH et d'autres antibiotiques dans leurs concentrations sous-bactériostatiques. Il est difficile d'expliquer ce phénomène mais il a été montré par Mitchison et Selkon (51) que les animaux immuns soumis à une forte réinfection puis traités par l'INH présentaient des bacilles moins nombreux dans la rate que les animaux neufs traités de la même manière. Il semble que les cellules d'animaux vaccinés sont modifiées de telle sorte qu'elles retardent la multiplication des bacilles de réinfection et qu'elles réagissent mieux en présence des antibiotiques.

VI - ETUDE SIMULTANEE DES FACTEURS HUMORAUX

ET CELLULAIRES.

Suter (68) n'avait pas pu mettre en évidence d'action renforçatrice en ajoutant du sérum immun aux cellules immunes infectées. Pour Fong et coll. (12) le sérum immun augmente la résistance des monocytes immuns contre l'infection.

Nous avons étudié la croissance des bacilles intracellulaires en présence de sérums dilués à 40 % et à 80 %. Comme, selon Raffel (57) la présence du sérum immun réduit la phagocytose au lieu de l'augmenter, nous n'avons pas ajouté le sérum au moment de la phagocytose, nous aurions, sans cela, été entraînés en dehors des limites fixées à cette étude.

Le plan des expériences était le même que dans les chapîtres précédents. La croissance a été observée jusqu'au septième jour. Le pourcentage des monocytes infectés était déterminé, et les monocytes contenant des bacilles intracellulaires étaient classés en trois groupes suivant leur contenu : de 1-2 bacilles, 3-10 et plus de 10 bacilles (tableau 6, et fig. 11).

Dans les cellules normales, l'addition du sérum normal (tableau VI) ou même du sérum immun (chap. IV, tableau II) n'a guère modifié la multiplication bacillaire.

Par contre, le sérum immun ajouté aux cultures cellulaires d'animaux vaccinés, désensibilisés ou non, ralentit encore légèrement la croissance intracellulaire des bacilles tuberculeux (tableau VI, fig. 11).

TABLEAU VI - Croissance du bacille tuberculeux dans les monocytes provenant des cobayes normaux, vaccinés et vaccinés désensibilisés, en milieu contenant sérums homologues 40 % et 80 %

Sérum de veau 20 %				CELLULES NORMALES				Sérum de cobaye 80			
Sérum de cobaye 40 %				Sérum de veau 20 %				Sérum immun 40 %			
a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
10	90	10	-	10	90	10	-	10	90	10	-
20	30	60	10	18	30	60	10	20	40	52	
20	10	50	40	20	5	45	50	20	15	45	4
12	95	5	-	12	95	5	-	12	95	5	-
15	40	55	5	15	50	50	-	15	50	50	-
20	10	30	60	18	13	33	54	18	10	40	5
14	94	6	-	14	94	6	-	14	94	6	-
16	45	50	5	17	50	50	-	15	42	54	
18	10	40	50	15	10	44	46	15	6	50	4

CELLULES VACCINEES											
Sérum de veau 20 %				Sérum immun 40 %				Sérum immun 80 %			
a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
10	96	4	-	10	96	4	-	10	96	4	-
15	40	58	2	12	50	48	2	12	50	50	-
16	15	53	32	16	5	70	25	17	10	75	15
12	90	10	-	12	90	10	-	12	90	10	-
15	56	44	-	10	50	50	-	12	52	48	-
15	10	60	30	15	30	50	20	12	35	50	15
12	92	8	-	12	92	8	-	12	92	8	-
15	50	50	-	12	49	50	1	10	50	45	5
15	15	57	28	14	10	72	18	12	15	68	17

CELLULES VACCINEES DESENSIBILISEES											
Sérum de veau 20 %				Sérum immun 40 %				Sérum immun 80 %			
a	b			a	b			a	b		
%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10	%	1-2	3-10	plus 10
12	90	10	-	12	90	10	-	12	90	10	-
15	45	53	2	15	45	55	-	12	50	48	2
16	14	60	26	15	12	58	30	10	22	65	13
11	93	7	-	11	93	7	-	11	93	7	-
13	50	50	-	12	48	52	-	13	58	42	-
13	18	60	22	10	18	62	20	13	20	63	17
15	90	10	-	15	90	10	-	15	95	10	-
15	50	50	-	15	60	40	-	15	55	45	-
17	20	53	27	15	18	63	19	13	15	65	20

a. Pourcentage de monocytes infectés.

b. Parmi les cellules infectées, pourcentage des cellules contenant : 1-2 bacilles, 3-10 bacilles et plus de 10 bacilles.

Nombre de bacilles dans une population de
1000 monocytes.

LÉGENDE
Cellule normale ○
—d°— en sérum normal ⊙
Cellule vaccinée Δ désensibilisée--Δ--
—d°— en sérum immun △

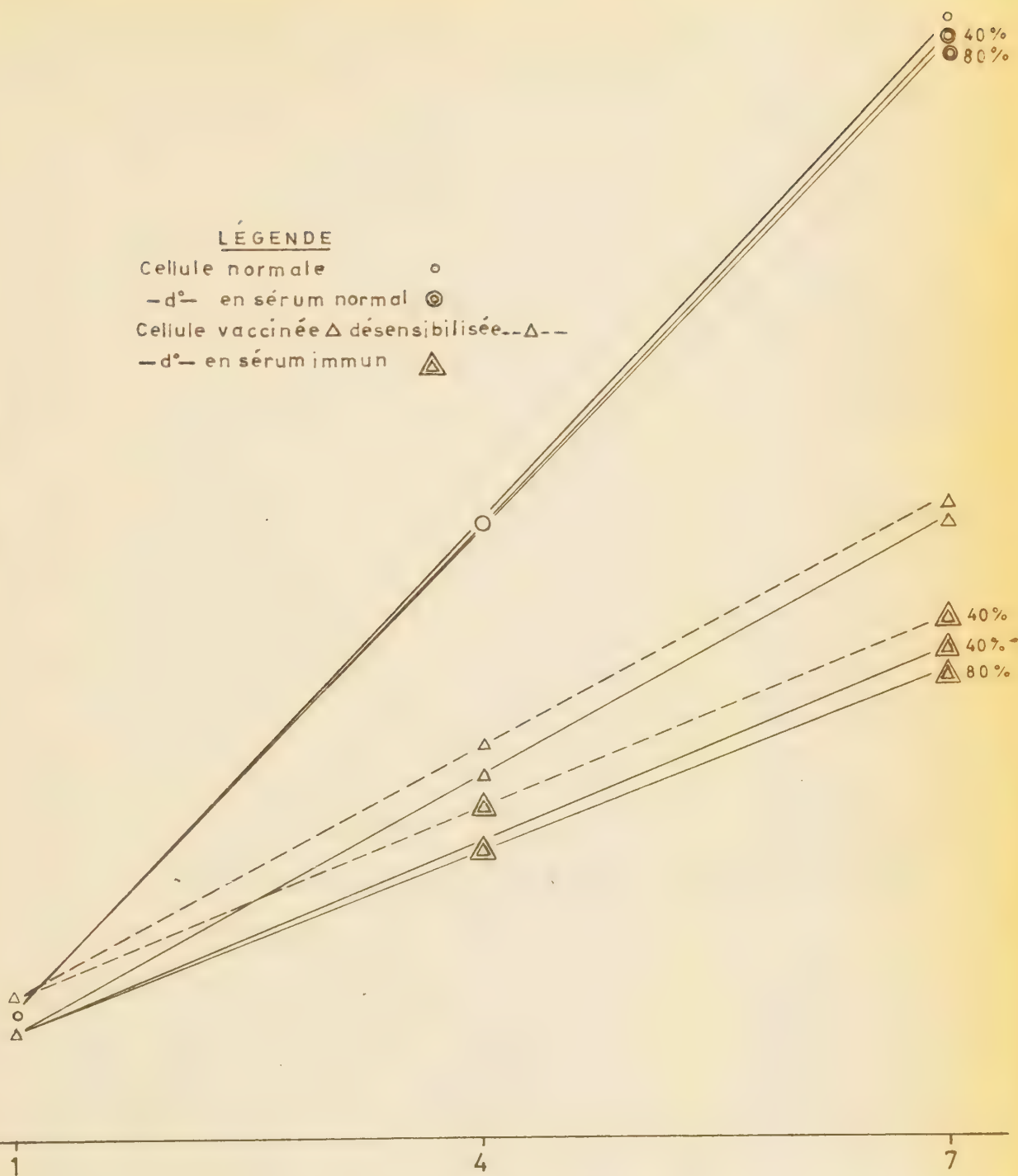


Fig. 11 - Effet de sérums homologues 40 et 80% sur la croissance de bacilles tuberculeux intracellulaires.

Discussion :

Dans les cultures de tissu, nous ne pouvons pas reproduire les conditions in vivo d'un organisme intact. Certes les tissus sont vivants, mais ils ne sont qu'un excellent milieu de croissance. Les cultures de tissu sont dépourvues du contrôle nerveux et de la circulation sanguine.

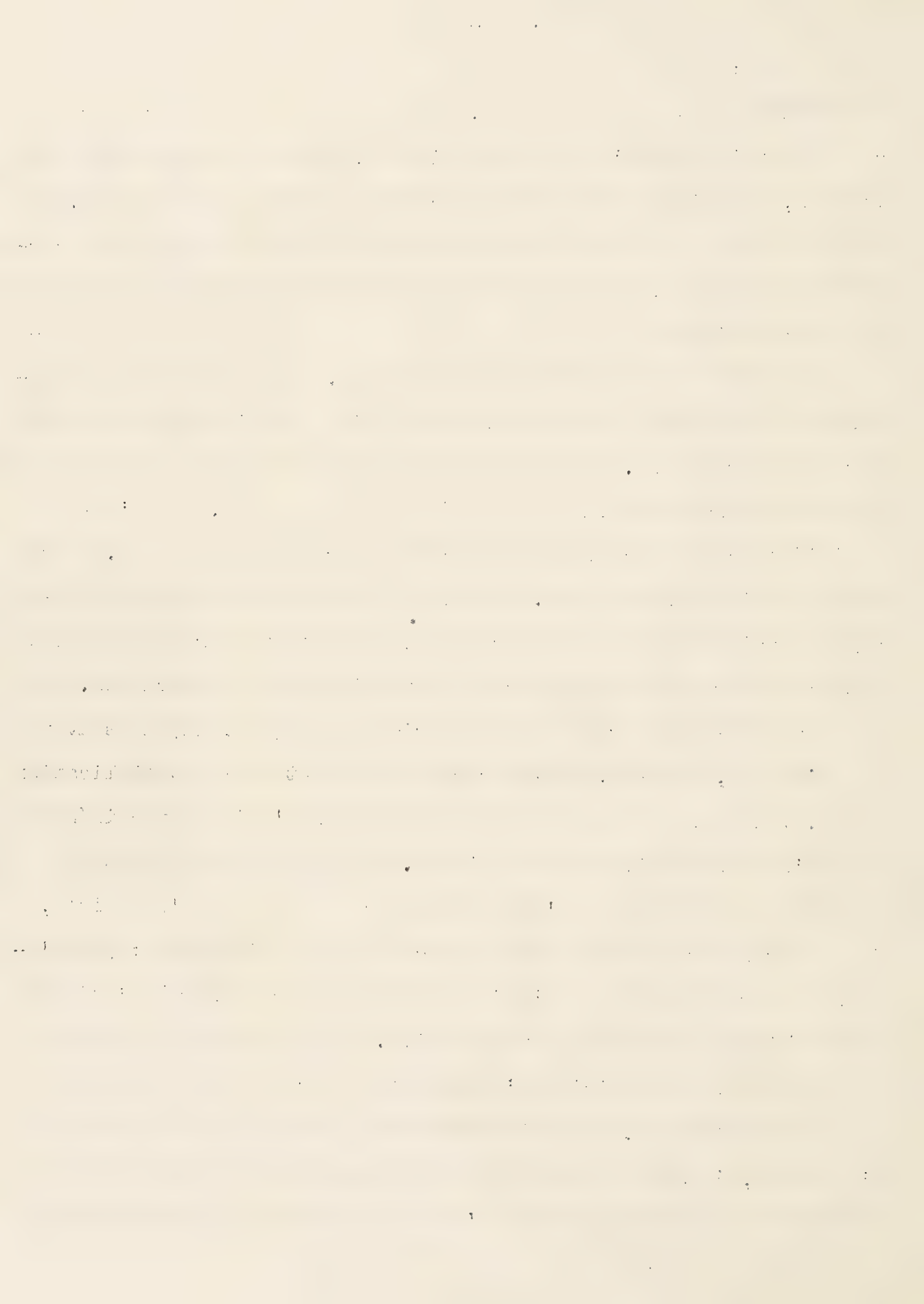
Par addition de sérums homologues nous avons essayé de reproduire partiellement les conditions in vivo. Les cultures cellulaires poussent aussi bien que dans les milieux nutritifs contenant des sérums hétérologues.

Nous avons déjà vu que les sérums immuns (chap. IV) n'ont pas modifié la croissance bacillaire dans les cellules normales. Nous avons aussi démontré (chap. V) que les cellules provenant des cobayes vaccinés ont pu ralentir la multiplication intracellulaire du bacille tuberculeux en comparaison avec les cellules normales.

Dans nos dernières études expérimentales (fig. 11) nous avons vu qu'il y a, de plus, un léger ralentissement de la multiplication des B.K. intracellulaires dans les monocytes d'animaux vaccinés lorsqu'on les cultive en sérum immun.

Ce qui est certain c'est que le facteur sérique s'il existe, joue un rôle très faible dans le mécanisme de l'immunité : jusqu'alors le sérum immun seul n'a jamais permis de conférer à l'animal neuf ou infecté une résistance passive.

Il est très difficile d'interpréter l'action des anticorps par les études in vitro. Dans les études in vivo sur le mécanisme d'immunité, il semble que les cellules du système réticulo-histio-



cytaire soient modifiées, et qu'elles puissent exercer une action inhibitrice sur les bacilles de réinfection à l'aide des humeurs au contact desquelles elles se trouvent.

In vitro les sérums immuns semblent aider les cellules immunes dans leur pouvoir inhibiteur vis-à-vis des bacilles tuberculeux. Dans l'organisme cette propriété peut être plus forte.

VII - ETUDES SUR L'ALLERGIE

Rich et Lewis (61) traitèrent les cultures de tissu d'animaux sains et tuberculeux avec diverses dilutions de tuberculine brute. Ils considèrent la migration des leucocytes, à partir de la masse centrale de tissu, comme l'indication de l'activité normale des tissus. Ils ont démontré que la tuberculine inhibe la migration des leucocytes de tissus tuberculeux, à une concentration moins forte que celle de tissus normaux. Ils ont aussi prouvé que le facteur humoral ne jouait aucun rôle dans ce phénomène et ils établirent que l'allergie est transmissible dans les cultures de tissu. Leurs études furent confirmées par plusieurs auteurs (3, 24, 25, 29, 52, 53).

Fischer (17) utilisa des fibroblastes de douzième passage des poules infectées par *Mycobacterium tuberculosis* var. aviaire; il démontra que ces cellules n'étaient pas sensibles à la tuberculine brute aviaire.

Heilman et Seibert (25) ont utilisé les tuberculines purifiées (P.P.D.) et leurs diverses fractions. Ils ont trouvé que la fraction protéidique est spécifiquement cytotoxique tandis que la fraction polyosidique ne l'est pas. Ils démontrèrent que la P.P.D. est cent fois plus active que la tuberculine brute.

O'Neill et Favour (56) en utilisant une nouvelle technique d'étude de la migration des leucocytes dans les tubes capillaires, ont démontré que le phénomène d'allergie ne peut être mis en évidence qu'avec des cellules du système réticulo-histiocytaire seul.



La tuberculine n'est pas toxique pour d'autres tissus.

Protocole expérimental.

Jusqu'alors les chercheurs ont étudié l'effet toxique de la tuberculine par son pouvoir d'inhiber la migration des leucocytes à partir d'une culture de tissu (la rate, la moëlle, les ganglions) ou de couche leucocytaire de sang (buffy coat). Cette propriété toxique était très difficile à étudier dans les cultures cellulaires. Nous avons considéré la mort franche de cellules comme une indication d'effet toxique de la tuberculine.

A doses faibles, la tuberculine excite les cellules et la culture paraît beaucoup plus active que la culture témoin (Fig. 12, 13, 15, 16).

Sous l'influence de concentrations toxiques de la tuberculine la cellule se contracte et le noyau est à peine visible, quelquefois on ne peut même plus le voir. On voit les cellules comme des petites taches cytoplasmiques (fig. 14, 17), colorées en rouge par l'Hémalun-Eosine. Nous n'avons même pas utilisé l'apparition des vacuoles cytoplasmiques comme indication de toxicité parce que dans nos cultures, la présence de gouttelettes d'huile de paraffine compliquait l'étude de cette propriété.

Nous avons commencé par rechercher la dose toxique de la tuberculine. Les premiers essais ont été faits aux doses suivantes:

Tuberculine brute :	1/100	1/1000	1/10.000
IP 48	10.000 unités	1.000 unités	100 unités.

Fig. 14 - Contraste de phase.

Aspect de culture cellulaire après 3 jours.

Nécrose complète des cellules par concentration forte de la tuberculine (200 mg/cm³). Gr. 85 fois.

Fig. 15 - Aspect de la culture cellulaire normale après 3 jours.
Colorée par Hémalun-Eosine.
Gr. 135 fois.

Fig. 16 - Aspect de culture après 3 jours provoqué par l'action de la tuberculine en concentration faible. Coloré par Hénalun-Eosine. Gr. 135 fois.

Fig. 17 - Aspect de culture après 3 jours. Coloré par Hénalun-Eosine. Nécrose complète des cellules par concentration forte de la tuberculine (200 mg/cm³). Gr. 135 fois.

Les cultures sont restées vivantes et actives.

Les dilutions dans 1cm³ de milieu finalement utilisées ont été :

Tuberculine brute	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
Malléine brute	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
Glycérine	1/2	1/5	1/10	1/20	1/40	1/80
I.P. 48 humaine	80 mg	40 mg	20 mg	10 mg	5 mg	1 mg
Fraction Pt.	id.	id.	id.	id.	id.	id.

Il a été très difficile d'observer les changements de pH parce que lors de l'addition des tuberculines à de telles dilutions, la couleur du milieu devenait jaune foncé et rendait donc l'interprétation très difficile. Nous avons dû étudier uniquement l'altération de la morphologie des cellules par ces différents produits.

Dans le tableau VII, nous avons vu que la tuberculine et ses fractions protéidiques sont toxiques pour les tissus tuberculeux et vaccinés à des concentrations moins fortes que pour les cellules normales. Nous avons vu que la glycérine qui existe en concentration importante dans la tuberculine brute est elle même toxique à la dilution de 1/10 pour toutes sortes de cellules. Il est possible qu'à la concentration de 1/5 à laquelle la tuberculine brute est toxique pour les cellules normales cette action ne soit pas spécifique. La malléine brute que nous avons employée comme témoin protéinique est toxique à la dilution de 1/10 pour toutes les cellules. Il faut cependant noter que la concentration de la glycérine est plus forte dans la malléine que dans la tuberculine brute préparée à partir du milieu de Sauton.

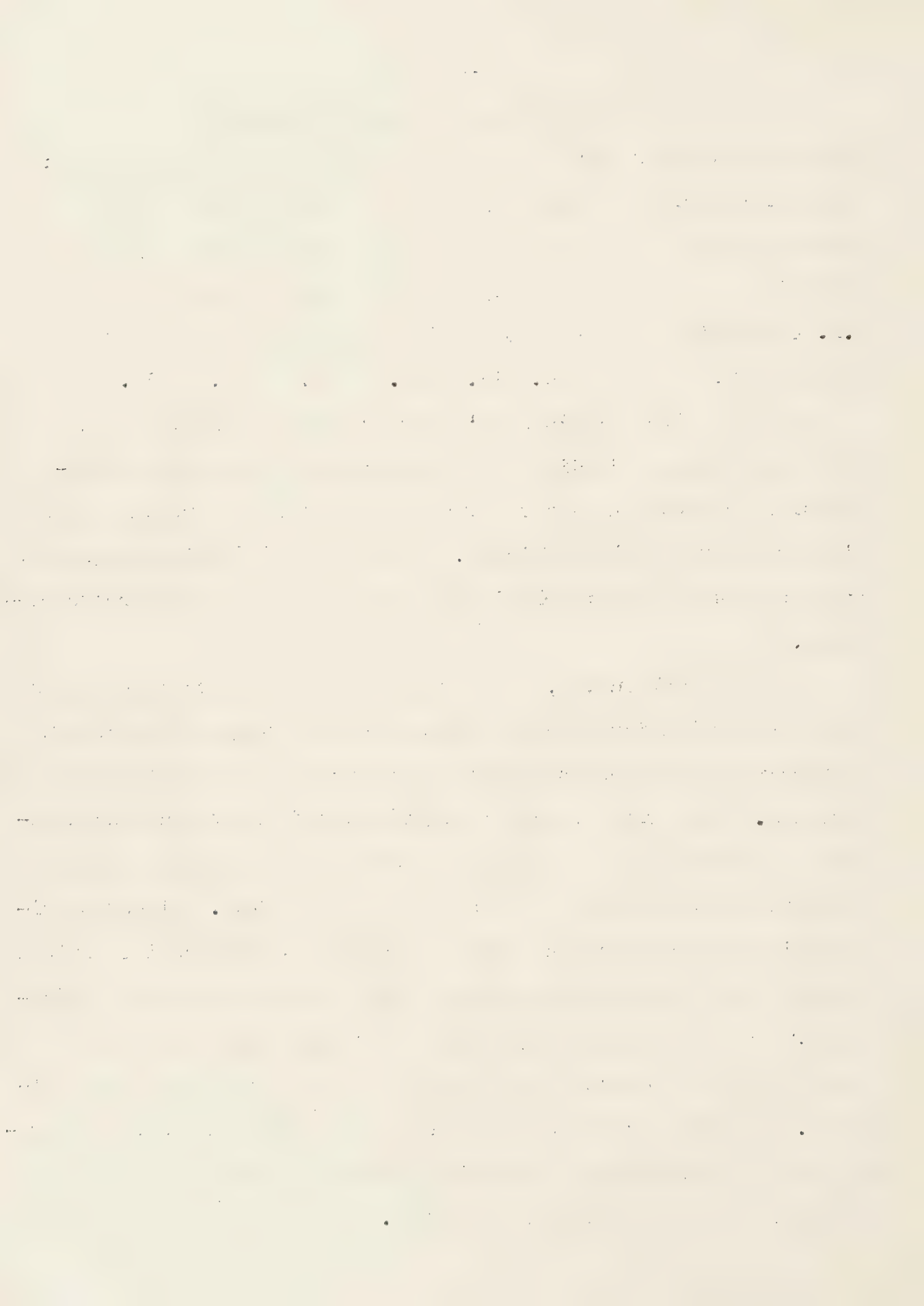


TABLEAU VII

Les doses toxiques de la tuberculine brute, IP 48, fraction Pt, malléine et la glycérine sur les cellules provenant de cobayes normaux, tuberculeux, vaccinés et vaccinés désensibilisés.

Les doses sont p. cm³

MONOCYTES	GLYCERINE	TUBERCULINE BRUTE	IP 48	FRACTION Pt.	MALLÉINE
Normaux	1:10	200 mg (1:5)	80 mg.	80 mg	1:10
Tuberculeux	1:10	50 mg (1:20)	10 mg	10 mg	1:10
Vaccinés	1:10	50 mg (1:20)	10 mg	10 mg	1:10
Vaccinés Désensibilisés	1:10	200 mg (1:5)	80 mg	80 mg	1:10

Il est évident que les doses toxiques dans nos expériences sont très élevées en comparaison des travaux des autres chercheurs. Mais de toute façon il a été observé que les cellules allergiques étaient intoxiquées par des doses de tuberculine plus faibles que les cellules normales. Les cellules provenant des cobayes vaccinés désensibilisés se comportent comme les cellules des témoins. Il a été dit que les cellules tuberculeuses sont fragiles (16), mais dans nos expériences elles étaient intoxiquées par les mêmes doses de protéines témoins que les cellules normales, ainsi que les cellules immunisées.

Discussion

Donc nous pouvons dire que :

- a) La toxicité cellulaire de la tuberculine et de ses fractions est spécifique.
- b) La tuberculine et ses fractions agissent contre les cellules vaccinées désensibilisées de la même façon que contre les cellules normales et non les cellules allergiques.
- c) Sur une base pondérale la tuberculine brute était toxique à la même dose que la tuberculine IP48 qui est une tuberculine purifiée. Mais la toxicité de la tuberculine brute était compliquée par la présence de glycérine, elle même légèrement toxique.

Nous avons trouvé comme Rich et Lewis que l'action de la tuberculine est spécifique contre les cellules allergiques quelle que soit leur origine (cobayes vaccinés ou tuberculeux), et qu'il est possible de désensibiliser les animaux allergiques de façon à ce que leurs cellules soient aussi désensibilisées.

O'Neill et Favour ont montré que les cellules du système réticulo-histiocytaire seules sont capables de montrer ce phénomène. Les résultats négatifs de Fischer signifient peut être que l'allergie n'est pas transmise aux générations suivantes chez les cellules en culture. Les données sur ce sujet sont très rares et il n'est pas encore possible d'en tirer des conclusions nettes. Il serait intéressant d'étudier l'action de la tuberculine sur les cellules épithéliales obtenues à partir d'exsudat péritonéal (31). Nos essais pour

préparer une souche à partir de l'exsudat péritonéal du cobaye ont échoué jusqu'alors, ainsi que ceux de Lê Quan Sang (32). Les cellules meurent après la deuxième ou la troisième trypsination. Si l'on pouvait arriver à préparer des souches cellulaires des cobayes normaux et vaccinés on pourrait étudier la transmissibilité de l'allergie et de l'immunité aux générations suivantes.

VIII - RESUME ET CONCLUSIONS

Le mécanisme exact de l'immunité dans la tuberculose n'est pas encore connu. Il a été montré que la résistance contre la tuberculose est différente de l'allergie et persiste longtemps après que l'allergie ait disparu. Il n'est pas possible de transférer l'immunité passive par injections de sérums immuns.

Il y a donc des raisons de penser que c'est au sein des tissus eux-mêmes qu'a lieu la modification qui confère la résistance à la maladie. D'autres auteurs ont déjà démontré la transmissibilité de l'allergique tuberculinique des monocytes dans les cultures de tissu de première explantation. Il est également possible de transférer l'allergie passivement par injections de suspension de monocytes. Enfin, on sait que la croissance de bacilles tuberculeux est ralentie à l'intérieur des macrophages provenant des lapins immunisés par le B.C.G. On peut aussi le démontrer en cultures cellulaires tandis que quelques chercheurs n'ont pas obtenu le ralentissement de la croissance bacillaire à l'intérieur des cellules d'animaux immuns.

Notre travail a consisté à étudier les cellules de l'exsudat péritonéal de cobayes normaux, vaccinés, vaccinés puis désensibilisés et tuberculeux. Nous avons comparé les infections massives et légères des monocytes par le bacille tuberculeux avec ou sans addition de streptomycine au milieu de croissance. Nous avons cherché

les de ces derniers que dans celles provenant d'animaux témoins. Par contre, les cellules d'animaux vaccinés, ou vaccinés puis désensibilisés ne permettent qu'une multiplication beaucoup plus lente ce qui indique l'acquisition d'une propriété cellulaire intrinsèque, indépendante de toute influence extérieure et dirigée spécifiquement contre le germe en question. Par ailleurs, il est important de noter que cette propriété n'est pas modifiée par la désensibilisation de l'animal. Ce fait confirme l'indépendance de l'allergie et de l'immunité dans la tuberculose.

On peut dire que la vaccination par le B.C.G. confère une résistance cellulaire contre l'infection tuberculeuse et c'est pourquoi l'animal vacciné peut résister à la maladie mieux qu'un autre non immunisé.

Pourquoi les macrophages d'un animal tuberculeux ne montrent-ils pas cette propriété inhibitrice? Peut être cette propriété a-t-elle été préalablement acquise puis affaiblie à cause de l'activité incessante du système réticulo-histiocytaire contre l'infection progressive de la tuberculose. Par contre, au cours de la vaccination par le B.C.G., la croissance bacillaire est auto-limitée, en raison du développement de l'immunité.

L'adjonction des antibiotiques aux concentrations sous-bactériostatiques a une action adjuvante sur les cellules vaccinées et ralentit la croissance intracellulaire. C'est un fait de plus en faveur de la modification des tissus.

La technique que nous avons utilisée permet d'obtenir certains renseignements sur l'immunité d'un animal donné à l'échelon de la cellule et ceci sans l'infecter ni le sacrifier. On peut espérer que des perfectionnements permettront d'arriver à une méthode qui, mesurant à la fois l'immunité cellulaire et l'immunité humorale du même animal, comme dans certaines de nos expériences, permettra véritablement de mesurer l'immunité de cet animal.



- 9 - CARREL A. et EBELING A.H.
The fundamental properties of the fibroblast and
the macrophage. II. The macrophage.
Journ. Exper. Med., 1926, 44, 285
- 10 - CHASE M.W.
The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity
to tuberculin.
Proc. Soc. Exper. Biol. and Med., 1945,
59, 134
- 11 - CUNNINGHAM R.S., SABIN F.R., SUGIYAMA S., KINDWALL J.A.
The role of monocyte in tuberculosis.
Bull. Johns Hopkins Hosp., 1925, 37, 1925
- 12 - DOAN C.A., SABIN F.R., FORKNER C.E.
Studies on tuberculosis
Journ. Exper. Med., 1930, 52, Supp. 3,
1-152
- 13 - DUNNING H.S., FURTH J.
Studies on the relation between microglia,
histiocytes and monocytes.
Am. Journ. Path., 1935, 11, 895
- 14 - EVANS H.M. et SCOTT K.J.
On the differential reaction to vital dyes exhibited
by two great groups of connective tissue cells.
Carnegie Inst. Wash. Contrib. Embryol.,
1921, 10, 1
- 15 - FAVOUR C.B., FREMONT-SMITH P. et MILLER J.M.
Factors affecting the in vitro cytolysis of white
blood cells by tuberculin
Am. Rev. Tuberc., 1949, 60, 212
- 16 - FAVOUR C.B.
In vitro effect of tuberculin on cells.
Advances in tuberculosis research. 1951,
vol. IV, 219
- 17 - FISCHER A.
Tuberkulin und Fibroblasten
Zschr. f. Immunitätsforsch u. exper.
Therap., 1928, 56, 24



- 18 - FONG J., SCHNEIDER P. et ELBERG S.S.
Studies on tubercle bacillus-monocyte relationship.
I - Quantitative analysis of effect of serum of
animals vaccinated with B.C.G. upon bacterium-
monocyte system.
Journ. Exper. Med., 1956, 104, 455

II - Induction of monocyte degeneration by bacteria
and culture filtrate : specificity of serum and
monocyte effects on resistance to degeneration.
Ibid., 1957, 105, 25

FONG J., CHIN D., AKIYAMA H.J. et ELBERG S.S.
III - Conditions affecting the action of serum and
cells. Modification of bacilli in an immune system.
Ibid., 1959, 109, 523
- 19 - GOLDMAN E.
Neue untersuchungen über die äussere und innere
sekretion des gesunden und kranken Organismus im
lichte der "vitalen" farbung
ZTschr. Klin. Chir., 1912, 78, 1
- 20 - HANKS J.H. et EVANS B.
The action of serum, cells and blood on acid fast
bacteria in vitro
Am. Rev. Tuberc., 1940, 41, 605
- 21 - HANKS J.H. et WALLACE R.E.
Relation of Oxygen and temperature in the preserva-
tion of tissue by refrigeration.
Proc. Soc. Exper. Biol. et Med., 1949,
71, 196
- 22 - HANKS J.H.
Assay of the mycobacteria in cell and tissue
cultures.
Am. Rev. Tuberc., 1958, 77, 789
- 23 - HEATHERINGTON D.C. et PIERCE E.J.
The transformation of monocytes in to macrophages
and epithelioid cells in tissue cultures of buffy
coats (demonstrated with tripan blue).
Arch. Exper. Zellforsch., 1931, 12, †
- 24 - HEILMAN D.H., FELDMAN W.H. et MANN F.C.
Specific cytotoxic action of tuberculin and
quantitative studies on tissue culture.
Am. Rev. Tuberc., 1944, 50, 344

- 25 - HEILMAN D.H. et SEIBERT F.B.
The effect of purified fractions of tuberculin on
tuberculin sensitive tissue.
Am. Rev. Tuberc., 1946, 53, 71
- 26 - KOCH R. Ueber die aetiologie der tuberkulose.
Berlin. Klin. Wschr., 1882, 19, 221.
- 27 - KOCH R.
Die aetiologie der tuberkulose.
Mitt. Kais. Gesundheitsamte, 1884, 2, 1
- 28 - LANG F.J.
The reaction of lung tissue to tuberculeus infec-
tion in vitro.
Journ. Infect. Dis., 1925, 37, 430
- 29 - LASFARGUES E., BOQUET P. et DELAUNAY A.
Cultures de tissu appliquées à la solution de
problèmes immunologiques. IV Réactions tuberculi-
niques.
Ann. Inst. Pasteur, 1947, 73, 169
- 30 - LEPINE P., SLIZEWICZ P., DANIEL Ph., et PACCAUD M.
Cultures cellulaires dans un milieu utilisant
l'hydrolysate de caséine comme source d'acides
aminés.
Ann. Inst. Pasteur, 1956, 90, 654
- 31 - LE QUAN SANG et MAURIN J.
Isolement et entretien en lignée continue d'une
souche de cellules provenant d'un exsudat
péritonéal de lapin (Souche EPL).
Ann. Inst. Pasteur, 1960, 99, 210
- 32 - LE QUAN SANG
Communication personnelle
- 33 - LONG E.R. et HOLLEY S.W.
The origin of the epithelioid cells in experimen-
tal tuberculosis of the cornea.
Am. Journ. Path., 1933, 9, 337
- 34 - LURIE M.B.
On the mechanism of immunity in tuberculosis. The
host-parasite relationship under the conditions of
a localized agar focus of infection and the gene-
ralisation of the disease in normal and immunized
rabbits.
Journ. Exper. Med., 1936, 63, 923

- 35 - LURIE M.B.
The role of extracellular factors and local immunity in the fixation and inhibition of growth of tubercle bacilli.
Journ. Exper. Med., 1939, 69, 555
- 36 - LURIE M.B.
Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis. The mobilization of mononuclear phagocytes in normal and immunized animals and their relative capacities for division and phagocytosis.
Journ. Exper. Med., 1939, 69, 579
- 37 - LURIE M.B.
Studies on the mechanism of immunity in tuberculosis. The fate of tubercle bacilli ingested by mononuclear phagocytes from normal and immunised animals.
Journ. Exper. Med., 1942, 75, 247
- 38 - LURIE M.B.
Native and acquired resistance to tuberculosis.
Am. Journ. Med., 1950, 9, 591
- 39 - LURIE M.B.
Growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits.
Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 1059
- 40 - MACKANESS G.B.
The action of drugs on intracellular tubercle bacilli.
Journ. Path. Bact., 1952, 64, 429
- 41 - MACKANESS G.B. et SMITH N.
The bacteriocidal action of isoniazid, streptomycin, and terramycin on extracellular and intracellular tubercle bacilli.
Amer. Rev. Tuberc., 1953, 67, 322
- 42 - MACKANESS G.B., SMITH N. et WELLS A.Q.
The growth of intracellular tubercle bacilli in relation to their virulence.
Am. rev. Tuberc., 1954, 69, 479
- 43 - MACKANESS G.B.
The growth of tubercle bacilli in monocytes from normal and vaccinated rabbits.
Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 495

- 44 - MAXIMOW A.A.
Tuberculosis of mamalian tissue in vitro.
Journ. Infect. Dis., 1924, 34, 549
- 45 - MAXIMOW A.A.
Role of the nongranular blood leucocytes in the
formation of the tubercle.
Journ. Infect. Dis., 1925, 37, 419
- 46 - MAXIMOW A.A.
Etude comparative des cultures de tissus inoculées
soit avec B.K. du type bovin, soit avec le bacille
B.C.G.
Ann. Inst. Pasteur, 1928, 42, 225
- 47 - MAXIMOW A.A.
Cultures of blood leucocytes from lymphocytes and
monocytes to connective tissue.
Arch. Exper. Zellforsch., 1928, 5, 169
- 48 - METCHNIKOFF E.
Ueber die phagocytare rolle der Tuberkelriesenzellen.
Arch. Path. Anat., 1888, 113, 63
- 49 - METCHNIKOFF E.
Immunity in infective diseases
F.G. Binnie, Cambridge 1905
- 50 - MIDDLEBROOK G. et DUBOS R.J.
Specific serum agglutination of erythrocytes sensi-
tized with extracts of tubercle bacilli.
Journ. Exper. Med., 1948, 88, 521
- 51 - MITCHISON D.A. et SELKON J.B.
Bactericidal activities of antituberculous drugs.
Am. Rev. Tuberc., 1956, 74, 109 (Supp.)
- 52 - MOEN J.K. et SWIFT H.F.
Tissue culture studies on bacterial hypersensitivity.
I - Tuberculine sensitive tissues.
Journ. Exper. Med., 1936, 64, 339
- 53 - MOEN J.K.
Tissue culture studies on bacterial hypersensitivity.
III - The persistence in vitro of the inherent
sensitivity to tuberculin of cells from tuberculous
animals.
Journ. Exper. Med., 1936, 64, 943

- 54 - MORGAN J.F., MORTON L.S. et LITTLE R.L.
Nutrition of animal cells in tissue culture.
I - Initial studies on a synthetic medium.
Proc. Soc. Exper. Biol., 1950, 72, 1
- 55 - NEGRE L., BRETEY J. et ROY M.
Infra allergie décalée par les corps bacillaires
complets et résistance antituberculeuse conférée
par le B.C.G.
Ann. Inst. Pasteur, 1953, 92, 255
- 56 - O'NEILL E.F. et FAVOUR C.B.
Tissue culture analysis of tuberculin hypersensiti-
vity in man.
Am. Rev. Tuberc., 1954, 70, 577
- 57 - RAFFEL S.
The nature of acquired immunity in tuberculosis.
Specific and non specific factors (cellular and
humoral).
Bull. Internat. Union against Tuberc.,
1960, 30, 53
- 58 - RAFFEL S.
The mechanism involved in acquired immunity to
tuberculosis.
Ciba Foundation symposium on Experimental Tubercu-
losis, page 261. 1965.
- 59 - RAFFEL S.
Immunity. New York : Appleton-Century-Crofts.
1960, 3rd ed.
- 60 - RESCHAD H. et SCHILLING V.
Ueber einander korrelirende echte Webergangsfor-
men (spleen-syphilis) und ihr bedentung fur die
selbstheilende disposition.
Monatsh. Natur. Med., 1913, 60, 1931
- 61 - RICH A.R. et LEWIS M.R.
Mechanism of allergy in tuberculosis.
Proc. Soc. Exper. Biol. et Med., 1928,
25, 543

The nature of allergy in tuberculosis as revealed by
tissue culture studies.
Bull. Johns Hopkins Hosp., 1932, 50, 115

- 62 - RICH A.R.
The pathogenesis of tuberculosis
Illinois : C.C. Thomas, 1951, 2nd ed.
- 63 - SABIN F.R.
Cellular studies in tuberculosis.
Am. Rev. Tuberc., 1932, 25, 153
- 64 - SCHILLING V.
Das blutbild und seine Klinisch verwertung
Jena : G. Fischer, 1912
- 65 - SCHILLING V.
Ueber hochgradige monocytosen mit makrophagen bei
endocarditis ulcerosa und über die herkunft der
grossen mononucearen.
Ztschr. Klin. Med., 1919, 88, 377
- 66 - SMYTH H.F.
Reaction between bacteria and animal tissues under
conditions of artificial cultivation.
Journ. Exper. Med., 1915, 21, 103
- 67 - SMYTH H.F.
Cultivation of tubercle bacilli with animal tis-
sues in vitro.
Journ. Exper. Med. 1916, 23, 283
- 68 - SUTER E.
Multiplication of tubercle bacilli with in mononuc-
lear phagocytes in tissue cultures derived from
normal animals and animals vaccinated with B.C.G.
Journ. Exper. Med., 1953, 97, 235
- 69 - SUTER E.
Correspondence. To the editor of the American
Revue of tuberculosis.
Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 1060
- 70 - SUTER E.
Relation between growth inhibitory property of
monocytes for tubercle bacilli and hypersensitivity
to tuberculin. An in vitro study.
Ciba Foundation symposium on Experimental
Tuberculosis, page 198, 1955.
- 71 - THOMAS J.A.
Conception du système réticulo-histiocytaire. La
régulation de l'état histiocytaire et la spécifici-
té cellulaire.
Rev. d'Hématol., 1949, 4, 639.

DEUXIÈME THÈSE



PROPOSITIONS DONNÉES PAR LA FACULTÉ

L'action des antibiotiques sur les infections intracellulaires expérimentales.

Vu et approuvé :

Paris, le 4 Juin 1961

Le Doyen de la Faculté des Sciences,

J. PERES

VU

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean SARRAILH

